

Kullanım Talimatı

İN VİTRO TANI AMAÇLI KULLANIM İÇİNDİR.

Kullanım Amacı

VeriSeq™ NIPT Solution v2, gebeliğin en az 10. haftasında olan hamile kadınlardaki maternal periferik tam kan numunelerinden genom geneli fetal genetik anomalilerin saptanması için tarama testi olarak kullanılması amaçlanan bir *in vitro* tanı testidir. VeriSeq NIPT Solution v2, tüm kromozomlar için anöploidi durumunu ve tüm otozomlar için parsiyel duplikasyonları ve delesyonları saptamak üzere tüm genom dizileme işlevini kullanır. Test, cinsiyet kromozomu anöploidisinin (SCA) raporlanmasını talep etme seçeneği sunar. Bu ürün, tanı veya diğer gebelik yönetimi kararları için tek temel olarak kullanılmamalıdır.

VeriSeq NIPT Solution v2 şunları içerir: VeriSeq NIPT Microlab STAR için VeriSeq NIPT Workflow Manager v2, VeriSeq NIPT Sample Prep Kit ve VeriSeq NIPT Assay Software v2 içeren VeriSeq Onsite Server v2. VeriSeq NIPT Solution v2'nin yeni nesil sekans cihazı ile birlikte kullanılması amaçlanmıştır.

Testin Özeti ve Açıklaması

Başta anöploidi (anormal kromozom sayısı) olmak üzere fetal kromozom anormallikleri üreme yetersizliğinin, konjenital anomalilerin, gelişme geriliğinin ve zihinsel engellerin yaygın nedenlerindedir. Anöploidi 300 canlı doğumdan yaklaşık 1'ini etkilemektedir; düşük ve ölü doğumla ilişkili çok daha yüksek oranlar mevcuttur.^{1,2} Yakın zamana kadar bu bozukluklar için iki tip prenatal test vardı: tanı testleri veya tarama. Tanı testleri amniyosentez veya kronik villus örnekleme gibi invaziv prosedürleri içermektedir. Bu test yöntemleri, fetal anöploidinin saptanması için altın standart olarak görülmektedir. Ancak bunlar, %0,11 ile %0,22 arasında gebelik kaybı riskiyle ilişkilidir.³ Konvansiyonel çoklu belirteç taramaları invaziv olmadığından gebelik kaybı riski taşımaz ancak bunlar tanı testlerinden daha az hassastır. Trizomi 21 için saptama oranları; söz konusu taramaya, maternal yaşa ve test sırasındaki gebelik süresine bağlı olarak %69 ile %96 arasında değişir.⁴ Önemli bir şekilde yaklaşık %5 yalancı pozitif oranına sahiptir ve bu durum doğrulama için invaziv tanı testi yapılmasına, böylece prosedürle ilgili gebelik kaybı riskine yol açabilir.⁴ Ultrason taramalarında da kromozom anomalileri saptanabilir ancak kesinlik oranı diğer yöntemlerden de azdır.

21, 18, 13, X ve Y kromozomları için fetal anöploidi invaziv olmayan prenatal test (NIPT) ile gebeliğin 10. haftasında veya daha sonra maternal plazmadan alınan hücresiz DNA'nın (cfDNA) tüm genom sekanslaması kullanılarak yüksek hassasiyet derecesiyle tespit edilebilir. Kısa süre önce gerçekleştirilen bir çoklu klinik çalışma meta analizinde, tekil gebeliklerde trizomi 21 ve trizomi 18 için havuzlanan ağırlıklı saptama oranları ve özgüllükler şu şekilde raporlanmıştır: sırasıyla trizomi 21 için %99,7 ve %99,96 ve trizomi 18 için %97,9 ve %99,96.⁵ Bir çalışmada, tüm gebeliklerde birincil tarama olarak NIPT kullanımının doğrulayıcı invaziv prosedürlerin sayısında %89 azalma sağlayabileceği ortaya konmaktadır.⁶

Geleneksel çoklu belirteç taramasına kıyasla NIPT ile alınan yalancı pozitif oranlarındaki anlamlı azalma göz önünde bulundurulduğunda, çok sayıda tıbbi meslek örgütü NIPT kullanımına yönelik birtakım endikasyonları destekleyen beyanlar yayınlamıştır.

Özellikle International Society for Prenatal Diagnosis, American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG)/Society for Maternal Fetal Medicine (SMFM), American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) ve European Society of Human Genetics/American Society of Human Genetics, tüm hamile kadınlara NIPT seçeneğinin sunulmasını desteklemektedir.^{7,8,9} Test öncesi danışmanlık, bilgilendirilmiş olur ve pozitif cfDNA taraması sonucunu teyit etmek için tanı testi tavsiye edilmektedir.⁴

VeriSeq NIPT Solution v2; gebeliğin en az 10. haftasında olan kadınlardan alınan maternal periferik tam kan numunelerinden türetilen cfDNA parçacıklarının tüm genom sekanslama yönteminden yararlanan, invaziv olmayan bir in vitro tanı (IVD) testidir. Test iki adet tarama türü seçeneği sunar: temel ve genom geneli. Temel tarama yalnızca 21, 18, 13. kromozomların ve X ve Y kromozomlarının anöploidi durumuna ilişkin bilgi sağlar. Genom geneli taramalar tüm otozomlara ilişkin parsiyel duplikasyonlar ve delesyonlar ile tüm kromozomlara ilişkin anöploidi durumunu sunar. Her iki tarama türü fetal cinsiyet raporlaması ile birlikte veya bu raporlama olmadan cinsiyet kromozomu anöploidisini (SCA) raporlama seçeneği sunar. SCA raporlama seçeneği kapatılabilir. SCA raporlama seçeneği kapatılırsa fetal cinsiyet de raporlanmaz. Cinsiyet raporlama seçenekleri hakkında daha fazla bilgi için bkz. *VeriSeq NIPT Solution v2 Software Kılavuzu (belge no 1000000067940)*.

Prosedür İlkeleri

VeriSeq NIPT Solution v2, otomatik numune hazırlama ve sekanslama veri analizinden oluşan laboratuvar NIPT testine yönelik otomatik bir çözümdür. VeriSeq NIPT Sample Prep Kit yeni nesil sekanslama için 24, 48 veya 96 numunelik seriler hazırlamak için VeriSeq NIPT Microlab STAR ile birlikte kullanılan özel tek kullanımlık reaktiflerdir. Tüm genom, çift sonlu sekanslama verileri özel bir yazılım olan VeriSeq NIPT Assay Software v2 ile analiz edilir ve kalitatif sonuçları sunan bir rapor oluşturulur.

İş akışı, daha ayrıntılı olarak aşağıda açıklanan şu prosedürlerden oluşur: numune toplama, plazma izolasyonu, cfDNA ekstraksiyonu, kütüphane hazırlama, kütüphane miktar tayini, kütüphane havuzlama, sekanslama ve analiz:

- **Numune Toplama**—7–10 ml maternal periferik tam kan, hücre lizisi ve genom kontaminasyonunu önleyen ve tam kanı stabilize eden bir Streck cell-free DNA Blood Collection Tube'a (BCT) alınır.
- **Plazma İzolasyonu**—Plazma, toplandıktan sonraki 5 gün içinde standart santrifüj teknikleri kullanılarak maternal periferik tam kandan izole edilir. VeriSeq NIPT Microlab STAR plazmayı aspire eder ve daha sonra işlenmek üzere 96 kuyuluk bir derin kuyu plakasına dağıtır. Yeniden testin gerekli olduğu durumlarda, işleme sonrası numuneler kapatılıp ek olarak 5 gün süreyle 4 °C'de depolanabilir (kan toplama işleminden sonra toplamda en fazla 10 gün).



DİKKAT

Yukarıda belirtilen depolama sürelerinin aşılması, bağımsız numune başarısızlığı oranlarını olumsuz etkileyebilir.

- **cfDNA Ekstraksiyonu**—cfDNA'nın plazmadan saflaştırılması, kontaminantların temizlenmesi için bağlama plakasının yıkanması ve ayrıştırılmasıyla bir bağlama plakasına adsorpsiyonu yoluyla elde edilir.

- **Kütüphane Hazırlama**—Saflaştırılmış cfDNA fragmanları 5' ve 3' çıkıntıları kör uçlara dönüştürmek için bir uç onarımı işlemine tabi tutulur. Daha sonra, tek bazlı çıkıntı oluşturmak için 3' uçlara deoksiadenozin nükleotidi eklenir. Tek bazlı 3' deoksitimidin çıkıntısı içeren dizinlenen adaptörler daha sonra işlenmiş cfDNA fragmanları üzerine bağlanır. Bağlanan DNA, katı hal ters immobilizasyon boncukları kullanılarak saflaştırılır. 24, 48 veya 96'lık setlerdeki her bir numune dizinlenmiş eşsiz bir adaptör alır. Adaptörler 2 amaca hizmet eder:



DİKKAT

Dizinlerin çapraz kontaminasyonunu önlemek için son derece dikkatli olun; aksi halde hatalı sonuçlar elde edilebilir.

- Dizinler, daha sonraki sekanslama işlemi sırasında numune tanımlamaya olanak sunar.
- Dizin adaptörleri, küme oluşturma ve sonrasında sekanslama işlemi için sekanslama akış hücresinin katı yüzeyi üzerinde kütüphane yakalamaya olanak sunan sekanslar içerir.
- **Miktar Tayini**—Kütüphane ürünü miktar tayini, DNA standart eğrisine kıyasla belirlenen konsantrasyonda floresan boya kullanılarak yapılır.
- **Kütüphane Havuzlama ve Sekanslama**—Numune kütüphaneleri, kapsamdaki değişkenliği en aza indirmek için ayarlanan miktarlarda 24 veya 48 numunelik havuzlarda birlikte havuzlanır. Ardından her bir havuz yeni nesil sekanslama sistemi kullanılarak sekanslanır.
- VeriSeq NIPT Solution v2, sekanslama ekipmanı ve sarf malzemeleri içermez.
- **Analiz**—Analiz işlemi her bir numune için şunları içerir:
 - Kütüphane fragmanlarının dizin sekansına göre tanımlanması ve çift sonlu okumaların insan referans genomuna hizalanması.
 - Kütüphane fragmanlarının hem uzunluklarının hem genom koordinatlarının dağıtımından elde edilen bilgilerin birleştirilmesiyle kütüphanenin fetal fraksiyonunun tahmini.
 - Bilinen biaslar hesaba katıldıktan sonra bir istatistik modeli, tahmin edilen fetal fraksiyon düzeyindeki anomali ile uyumlu bir şekilde kütüphanede olması gerekenden az ya da fazla temsil edilen genom bölgelerini tespit eder.
 - NIPT raporu, KK başarılı numuneler için fetal fraksiyon tahmini ile birlikte ANOMALY DETECTED (ANOMALİ SAPTANDI) veya NO ANOMALY DETECTED (ANOMALİ SAPTANMADI) ifadesinin listelendiği seçili teste ilişkin özet sonuçları sunar.
 - Tamamlayıcı Rapor, saptanan her bir anomaliyi niteleyen kantitatif metrikler sağlar.

Prosedür Kısıtlamaları

Test Kısıtlamaları

- Testin duyarlılığını ve özgüllüğünü destekleyen kanıtlar tekil ve ikiz gebelikleri kapsamaktadır. Bu kullanım talimatları, üçüz veya daha fazla sayıda gebeliğe ilişkin duyarlılık ya da özgüllük verileri sağlamaz.

- VeriSeq NIPT Solution v2, triploidi gibi poliploidileri saptamaya yönelik değildir.
- VeriSeq NIPT Solution v2, dengeli yeniden kromozom düzenlemelerini saptamaya yönelik değildir.
- Test, gebeliğin en az 10. haftasında olan hamile kadınlardan alınan maternal periferik tam kan numuneleri gerektirir.
- Temel taramalar için VeriSeq NIPT Solution v2 testi belirli kromozom anormalliklerini arar. NO ANOMALY DETECTED (ANOMALİ SAPTANMADI) olarak raporlanan sonuçlar, test edilen kromozomların kromozal anormallik olasılığını ortadan kaldırmaz. Negatif bir sonuç gebelikte farklı kromozomal anormallikler, genetik hastalıklar veya doğum kusurları (ör. açık nöral tüp defekti) olması olasılığını ortadan kaldırmaz.
- Genom geneli taramalar için, kromozom boyutunun %75'inden az olan büyük delesyon ve duplikasyonlar, tam kromozom anöploidisinin göstergesi olabilir.
- Genom geneli taramalar için belirli bölgeler analiz dışında tutulur. Hariç tutulan bölgelerin listesine Illumina Destek web sitesinden ulaşabilirsiniz. Genom anomalisi saptama işlemi yalnızca hariç tutulmayan bölgeler üzerinde gerçekleştirilir.
- Cinsiyet raporlama konusunda geçerli yerel düzenlemeler nedeniyle fetal cinsiyet raporlaması tüm bölgelerde kullanılamamaktadır.
- Literatür kanıtlarına göre hücresiz DNA'ya dayalı tarama sonuçları belirli maternal ve fetal faktörlerle bozulabilir. Aşağıda bu faktörlerin yalnızca bazıları listelenmektedir:
 - Yakın zamandaki maternal kan transfüzyonu
 - Daha önce maternal organ nakli/kök hücre nakli
 - Maternal otoimmün hastalık
 - Maternal neoplazmlar (iyi huylu ve kötü huylu)
 - Maternal mosaisizm
 - Maternal kopya sayısı varyasyonları
 - Fetoplazental mosaisizm/plasentaya sınırlı mosaisizm
 - Fetal ölüm/kaybolan ikiz

VeriSeq NIPT Solution v2 Raporlaması

- VeriSeq NIPT Solution v2 bir tarama testidir ve diğer klinik bulgulardan ve test sonuçlarından bağımsız olarak değerlendirilmemelidir. Fetal durum ve gebelik yönetimi kararlarına ilişkin sonuçlar tek başına NIPT tarama sonuçlarına dayandırılmamalıdır.⁷

- VeriSeq NIPT Solution v2 aşağıdakileri raporlamaktadır:
 - Temel tarama 13, 18 ve 21. kromozomların olması gerekenden fazla temsil edilip edilmediğini test eder.
 - Genom geneli tarama, en az 7 Mb'lık parsiyel delesyonlar ve duplikasyonlar dahil olmak üzere tüm otozomların olması gerekenden az ya da fazla temsil edilip edilmediğini test eder.
 - Cinsiyet raporlama seçeneği Yes (Evet) veya SCA olarak belirlenen tekil gebeliklerde şu kromozomal cinsiyet anomalileri: XO, XXX, XXY ve XYY.
 - Cinsiyet raporlama seçeneği Yes (Evet) olarak belirlenen tekil gebeliklerde fetal cinsiyet raporlanır.
 - İkiz gebeliklerde Y kromozomunun varlığı.

Ürün Bileşenleri

VeriSeq NIPT Solution v2 aşağıdaki numune hazırlama kitlerini içerir:

- VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (24 samples) (parça no 20025895)
- VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (48 samples) (parça no 15066801)
- VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (96 samples) (parça no 15066802)

VeriSeq NIPT Solution v2 aşağıdaki yazılım bileşenlerini içerir:

- VeriSeq NIPT Assay Software v2 (parça no 20047024), VeriSeq Onsite Server v2'ye önceden kurulmuştur.
 - VeriSeq Onsite Server v2 (parça no 20028403, 20047000, 20101927) veya v2'ye yükseltilmiş mevcut bir VeriSeq Onsite Server (parça no 15076164 veya no 20016240).
- VeriSeq NIPT Workflow Manager v2, (parça no 20044988), VeriSeq NIPT Microlab STAR'a önceden kurulmuştur.
 - VeriSeq NIPT Microlab STAR (parça no Hamilton Company Reno: 95475-01 (115 V) & 95475-02 (230 V), Hamilton Company Bonaduz: 806288).
- Local Run Manager VeriSeq NIPT Module (parça no 20044989)

Reaktifler

Temin Edilen Reaktifler

illumina şu reaktifleri temin eder: VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (24 samples) (parça no 20025895), VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (48 samples) (parça no 15066801) ve VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (96 samples) (parça no 15066802). VeriSeq NIPT Sample Prep Kit, Hamilton Company tarafından tedarik edilen ML STAR (ML STAR) (parça no 95475-01, 95475-02 veya 806288) ile birlikte kullanım için yapılandırılmıştır.

VeriSeq NIPT Sample Prep Kit, Extraction Box

Tablo 1 VeriSeq NIPT Extraction Box (24) ve (48), Parça No 20025869 ve 15066803

Etiket Üzerindeki Reaktif Adı	Kitteki Kapların Sayısı	Aktif Bileşenler	Depolama
Lysis Buffer (Lizis Tamponu)	1	Tamponlanmış sulu çözeltide guanidin hidroklorür	15 °C ila 30 °C
Wash Buffer I (Yıkama Tamponu I)	1	Tamponlanmış sulu çözeltide guanidin hidroklorür ve 2-propanol	15 °C ila 30 °C
Wash Buffer II (Yıkama Tamponu II)	1	Tuzlar içeren tamponlanmış sulu çözelti	15 °C ila 30 °C
Elution Buffer (Elüsyon Tamponu)	1	Tamponlanmış sulu çözelti	15 °C ila 30 °C
Proteinase Buffer (Proteinaz Tamponu)	1	Tamponlanmış sulu çözeltide gliserol	15 °C ila 30 °C
Proteinase K (Proteinaz K)	3	Lyophilized Proteinase K (Liyofilize Proteinaz K)	15 °C ila 30 °C

Tablo 2 VeriSeq NIPT Extraction Box (96), Parça No 15066807

Etiket Üzerindeki Reaktif Adı	Kitteki Kapların Sayısı	Aktif Bileşenler	Depolama
Lysis Buffer (Lizis Tamponu)	1	Tamponlanmış sulu çözeltide guanidin hidroklorür	15 °C ila 30 °C
Wash Buffer I (Yıkama Tamponu I)	1	Tamponlanmış sulu çözeltide guanidin hidroklorür ve 2-propanol	15 °C ila 30 °C
Wash Buffer II (Yıkama Tamponu II)	2	Tuzlar içeren tamponlanmış sulu çözelti	15 °C ila 30 °C
Elution Buffer (Elüsyon Tamponu)	1	Tamponlanmış sulu çözelti	15 °C ila 30 °C
Proteinase Buffer (Proteinaz Tamponu)	1	Tamponlanmış sulu çözeltide gliserol	15 °C ila 30 °C
Proteinase K (Proteinaz K)	4	Lyophilized Proteinase K (Liyofilize Proteinaz K)	15 °C ila 30 °C

VeriSeq NIPT Sample Prep Kit, Library Prep Box

Tablo 3 VeriSeq NIPT Library Prep Box (24) ve (48), Parça No 20026030 ve 15066809

Etiket Üzerindeki Reaktif Adı	Kitteki Kapların Sayısı	Aktif Bileşenler	Depolama
End Repair Mix (Uç Onarım Karışımı)	1	Tamponlanmış sulu çözeltide DNA polimeraz ve dNTP'ler	-25 °C ila -15 °C
A-Tailing Mix (A-Kuyruklama Karışımı)	1	Tamponlanmış sulu çözeltide DNA polimeraz ve dATP	-25 °C ila -15 °C
Ligation Mix (Bağlama Karışımı)	1	Tamponlanmış sulu çözeltide DNA ligaz	-25 °C ila -15 °C
Hybridization Buffer (Hibridizasyon Tamponu)	1	Tamponlanmış sulu çözelti	-25 °C ila -15 °C
NIPT DNA Adapter Plate (NIPT DNA Adaptörü Plakası)	1	Tamponlanmış sulu çözeltide oligonükleotidler	-25 °C ila -15 °C

Tablo 4 VeriSeq NIPT Library Prep Box (96), Parça No 15066810

Etiket Üzerindeki Reaktif Adı	Kitteki Kapların Sayısı	Aktif Bileşenler	Depolama
End Repair Mix (Uç Onarım Karışımı)	1	Tamponlanmış sulu çözeltide DNA polimeraz ve dNTP'ler	-25 °C ila -15 °C
A-Tailing Mix (A-Kuyruklama Karışımı)	2	Tamponlanmış sulu çözeltide DNA polimeraz ve dATP	-25 °C ila -15 °C
Ligation Mix (Bağlama Karışımı)	2	Tamponlanmış sulu çözeltide DNA ligaz	-25 °C ila -15 °C
Hybridization Buffer (Hibridizasyon Tamponu)	1	Tamponlanmış sulu çözelti	-25 °C ila -15 °C
NIPT DNA Adapter Plate (NIPT DNA Adaptörü Plakası)	1	Tamponlanmış sulu çözeltide oligonükleotidler	-25 °C ila -15 °C

VeriSeq NIPT Sample Prep Kit, Accessory Box

Tablo 5 VeriSeq NIPT Accessory Box, Parça No 15066811

Etiket Üzerindeki Reaktif Adı	Kitteki Kapların Sayısı	Aktif Bileşenler	Depolama
DNA Binding Plate (DNA Bağlama Plakası)	1	Değiştirilmiş silikon membranlı propilen mikrolaka	2 °C ila 8 °C
Resuspension Buffer (Yeniden Askıya Alma Tamponu)	1	Tamponlanmış sulu çözelti	2 °C ila 8 °C
Sample Purification Beads (Numune Saflaştırma Boncukları)	1	Tamponlanmış sulu çözeltide katı halde paramanyetik boncuklar	2 °C ila 8 °C
DNA Quantification Reagent (DNA Miktar Tayini Reaktif)	1	DMSO'da DNA ekleme boyası	2 °C ila 8 °C
DNA Quantification Standard (DNA Miktar Tayini Standardı)	1	dsDNA standardı, spesifik olmayan DNA ve tamponlanmış sulu çözeltide sodyum azit	2 °C ila 8 °C

VeriSeq NIPT Sample Prep Kit, Workflow Tubes and Labels

Tablo 6 Workflow Tubes and Labels, Parça No 15071543

Etiket Üzerindeki Parça Adı	Kitteki Parçaların Sayısı	Depolama
Label (LBL)–Plate Barcode (Etiket [LBL]–Plaka Barkodu)	9	15 °C ila 30 °C
Label (LBL)–Deep-well Plate Barcode (Etiket [LBL]–Derin Kuyulu Plaka Barkodu)	12	15 °C ila 30 °C
Tube (TB)–Empty Pooling Tube (Tüp [TB]–Boş Havuzlama Tüpü)	5	15 °C ila 30 °C

Temin Edilmeyen Reaktifler

Gerekli Reaktifler (Temin Edilmeyen)

- Yeni nesil sekanslama (NGS) sistemi için gerekli sekanslama reaktifleri ve sarf malzemeleri
- Sertifikalı DNaz/RNaz içermeyen su – moleküler biyoloji sınıfı
- Etanol, %100 (200 proof) – moleküler biyoloji sınıfı

NOT Moleküler biyoloji sınıfında olmayan etanol kullanılması test performansını olumsuz etkileyebilir.

İsteğe Bağlı Reaktifler (Temin Edilmeyen)

- Şablonsuz kontrol (NTC) için Dulbecco Fosfat Tamponlu Salin (DPBS)

Depolama ve Taşıma

1. Oda sıcaklığı 15 °C ila 30 °C olarak tanımlanmıştır.
2. Tüm reaktifler yalnızca tek kullanımlıktır. Reaktifler kullanılmak üzere hazırlandıktan sonra hemen kullanılmalıdır.
3. VeriSeq NIPT Solution bileşenlerinin ambalajı veya içerikleri hasar görmüşse veya bozulmuşsa lütfen Illumina Müşteri Hizmetleri ile iletişime geçin.
4. Reaktifler belirtilen şekilde saklandıklarında kit etiketlerinde belirtilen son kullanım tarihine kadar stabildir. Depolama koşulları için [Reaktifler](#) bölümündeki tablolarda Depolama sütununa bakın. Son kullanım tarihi geçmiş reaktifleri kullanmayın.
5. Temin edilen reaktiflerin fiziksel görünümündeki değişiklikler materyallerin bozulduğunu gösterebilir. Fiziksel görünümde değişiklikler oluşursa (ör. reaktif renginde belirgin değişiklikler veya mikrobiyal kontaminasyonla gözle görünür bulanıklık) reaktifleri kullanmayın.
6. Numune Safılaştırma Boncuklarını kullanırken aşağıdaki en iyi uygulamalara uyun:
 - Boncukları asla dondurmayın.
 - Kullanmadan önce boncukların oda sıcaklığına ulaşmasını sağlayın.
 - Kullanmadan hemen önce, iyice askıya alınıncaya ve renk homojen görününceye kadar boncukları vorteksleyin.
7. Lizis Tamponu, Yıkama Tamponu I, Yıkama Tamponu II, Elüsyon Tamponu ve Proteinaz Tamponu görülebilir çökeltiler veya kristaller oluşturabilir. Kullanmadan önce güçlü bir biçimde vorteksleyin ve daha sonra çökelti kalmadığından emin olmak için görsel olarak inceleyin.
8. Alındıktan sonra tam kanı asla dondurmayın.
9. Havuzlamadan sonra kütüphaneleri en kısa sürede sekanslayın. Havuzlanan kütüphaneler -25 °C ila -15 °C'de yedi güne kadar stabildir. Bu koşullarda belirtilen süreyle depolanması durumunda ek denşirme yapılması gerekmez.

Ekipman ve Materyaller

Gerekli Ekipmanlar ve Materyaller (Temin Edilmeyen)

Gerekli Ekipmanlar, Temin Edilmeyen

Ekipman	Tedarikçi
Aşağıdaki özelliklere sahip yeni nesil sekanslama (NGS) sistemi: <ul style="list-style-type: none"> 2 x 36 bp çift sonlu sekanslama VeriSeq NIPT Sample Prep Kit çift dizin adaptörleriyle uyumlu BCL dosyalarının otomatik üretimi İki kanallı kimya Her çalıştırmada 400 milyon çift sonlu okuma VeriSeq NIPT Assay Software v2 veya NextSeq 550Dx Sequencing System ile uyumludur. 	Cihaz tedarikçisi veya Illumina, parça no 20005715
Dondurucu, -25 °C ila -15 °C	Genel laboratuvar tedarikçisi
Mikrosantrifüj	Genel laboratuvar tedarikçisi
Pipet desteği	Genel laboratuvar tedarikçisi
Buzdolabı, 2 °C ila 8 °C	Genel laboratuvar tedarikçisi
20 µl tek kanallı pipetler	Genel laboratuvar tedarikçisi
200 µl tek kanallı pipetler	Genel laboratuvar tedarikçisi
1000 µl tek kanallı pipetler	Genel laboratuvar tedarikçisi
Vorteksleyici	Genel laboratuvar tedarikçisi
Kan toplama tüpleri için santrifüj ve rotor tertibatı	
Eşdeğeri: <ul style="list-style-type: none"> Frensiz seçeneği olan 1600 x g kapasiteli soğutmalı santrifüj Kovalı salıncak kovalı rotor 76 mm minimum derinlikli kova eklentileri 16 mm x 100 mm kan toplama tüpünü destekleyecek eklenti adaptörleri 	Genel laboratuvar tedarikçisi

Ekipman	Tedarikçi
<p>Tavsiye edilen:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Allegra X12R Series Santrifüj, 1600 g • Allegra Santrifüj, Kovalı GH-3.8 Rotor • Allegra Santrifüj Kovası Kapakları, ikili set • Allegra Santrifüj Adaptörü Tertibatı, 16 mm, dördlü set 	<p>Beckman Coulter, parça no 392304 (120 V veya 230 V)</p> <p>Beckman Coulter, parça no 369704</p> <p>Beckman Coulter, parça no 392805</p> <p>Beckman Coulter, parça no 359150</p>
Mikroplakalar için santrifüj ve rotor tertibatı	
<p>Eşdeğeri:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 5600 x g kapasiteli santrifüj • 96 kuyulu plaka taşıyıcılarıyla salıncak plakalı rotor, 76,5 mm minimum derinlik. • Multifuge X4 Pro-MD 120 V TX-1000BT • Sorvall Legend XTR Santrifüj 	<p>Genel laboratuvar tedarikçisi</p> <p>Thermo Fisher Scientific no 75016034 Thermo Fisher Scientific, katalog no 75004521 (120 V) veya katalog no 75004520 (230 V)</p>
<ul style="list-style-type: none"> • HIGHPlate 6000 Mikroplaka Rotoru • Rotor high plate 6000 <p>Mikroplakalar için destek tabanı</p> <ul style="list-style-type: none"> • Tavsiye edilen: <ul style="list-style-type: none"> • MicroAmp 96-Kuyulu Destek Tabanı • 96-Kuyulu PCR Plaka Taşıyıcı 	<p>Thermo Fisher Scientific, katalog no 75003606 Thermo Scientific VWR katalog no 97040-244</p> <p>Thermo Fisher Scientific, katalog no 4379590 Thermo Fisher Scientific, katalog no AB-0563/1000</p>
SoftMax Pro v6.2.2-7.1.2 içeren aşağıdaki mikroplaka okuyuculardan (florometre) biri veya eşdeğeri:	
<ul style="list-style-type: none"> • Gemini XPS • SpectraMax M2, M3, M4 ve M5. <ul style="list-style-type: none"> • Mor eklenti, ışık akışında kullanılmak üzere mikroplaka okuyucu için gereklidir. 	<p>Molecular Devices, parça no XPS Molecular Devices, parça no M2, M3, M4 ve M5</p>
SpectraMax Yüksek Hızlı USB, Seri Adaptör	Molecular Devices, parça no 9000-0938

Ekipman	Tedarikçi
Aşağıdaki spesifikasyonlara sahip termal döngüleyici: <ul style="list-style-type: none"> Isıtmalı kapak 4 °C ila 98 °C sıcaklık aralığı ±2 °C sıcaklık hassasiyeti Saniyede 2 °C minimum artış oranı Twin.tec PCR Plakası 96-kuyulu, tam etekli cihaz ile uyumlu 	Genel laboratuvar tedarikçisi
VeriSeq NIPT Microlab STAR	Hamilton, parça no 95475-01 (115 V), parça no 95475-02 (230 V) veya parça no 806288 (Hamilton Company Bonaduz için)
VeriSeq Onsite Server v2 veya yükseltilmiş VeriSeq Onsite Server	Illumina, parça no 20028403 veya 20047000 (v2) ya da 20101927 veya no15076164 ya da no 20016240 (yükseltilmiş)
NextSeq 550Dx Sequencing System kullanıyorsanız: <ul style="list-style-type: none"> NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5, 75 cycles 	Illumina, parça no 20028870

İsteğe Bağlı Ekipmanlar (Temin Edilmeyen)

Ekipman	Tedarikçi
Pluggo Decapper Sistemi	LGP Consulting, parça no 4600 4450
SpectraMax SpectraTest FL1 floresan validasyon plakası	Molecular Devices, parça no 0200-5060
Tüp Döndürücü/Çevirici, 15 ml tüpler, 40 rpm, 100–240 V	Thermo Scientific, katalog no 88881001 (ABD) veya katalog no 88881002 (AB)

Gerekli Materyaller (Temin Edilmeyen)

Sarf Malzemesi	Tedarikçi
1000 µl İletken Steril Olmayan Filtre Ucu	Hamilton, parça no 235905
300 µl İletken Steril Olmayan Filtre Ucu	Hamilton, parça no 235903
50 µl İletken Steril Olmayan Filtre Ucu	Hamilton, parça no 235948

Sarf Malzemesi	Tedarikçi
<p>Aşağıdaki spesifikasyonlara sahip derin kuyu haznesi:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 96 piramit veya konik tabanlı kuyu ve 240 ml minimum kapasiteli SLAS 1-2004 mikrolaka formatı. • Tüm numune temas yüzeyleri için düşük DNA bağlama tercihli polipropilen. • Dahili boyutlar (sıvı düzeyi) VeriSeq NIPT Microlab STAR'ın otomatik aspirasyon ve dağıtım adımları ile uyumludur. • Yükseklik boyutları, VeriSeq NIPT Microlab STAR'ın otomatik hareketleri ile uyumludur. 	<p>Genel laboratuvar tedarikçisi</p> <p>Uyumlu hazneler:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Corning Axygen, ürün no RES-SW96-HP-SI • Agilent, ürün no 201246-100
<p>Aşağıdaki spesifikasyonlara sahip reaktif tüpü:</p> <ul style="list-style-type: none"> • VeriSeq NIPT Microlab STAR'ın taşıyıcısına sabit bir biçimde rahatça oturan, konik tabanlı ve 20 ml minimum kapasiteli tüp. • RNaz/DNaz içermeyen polipropilen. • Dahili hazne boyutları (sıvı seviyesi), VeriSeq NIPT Microlab STAR'ın otomatik aspirasyon ve dağıtım adımları ile uyumlu test reaktifi hacimleri kullanılarak sıvı seviyeleri oluşturur. • Yükseklik boyutları, VeriSeq NIPT Microlab STAR'ın otomatik hareketleri ile uyumludur. 	<p>Uyumlu tüpler:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Illumina Reagent Tub, parça no 20095418
<p>Aşağıdaki spesifikasyonlara sahip derin kuyu plakaları:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 96 piramit veya konik tabanlı kuyu ve 2 ml minimum kuyu kapasiteli SLAS 1-2004, 3-2004 ve 4-2004 mikrolaka formatı. • Tüm numune temas yüzeyleri için düşük DNA bağlama materyali tercihli saydam polipropilen. • Kuyu boyutları, VeriSeq NIPT Microlab STAR otomatik aspirasyon ve dağıtım adımları ile uyumlu bir sıvı seviyesi oluşturur. • Sabit, düz yüzey yapıştırma ile gereken konuma plaka barkodlarının yerleştirilmesine olanak sağlayan plaka eteği. • Minimum 5600 × g kapasiteli, torca dirençli çerçeve. • Plaka yükseklik boyutları, VeriSeq NIPT Microlab STAR'ın otomatik hareketleri ile uyumludur. 	<p>Genel laboratuvar tedarikçisi</p> <p>Uyumlu plakalar:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Eppendorf, parça no 0030505301 • Eppendorf, parça no 30502302 • USA Scientific, parça no 1896-2000

Sarf Malzemesi	Tedarikçi
<p>Aşağıdaki spesifikasyonlara sahip 384 kuyulu plaka:</p> <ul style="list-style-type: none"> Düşük hacimler için optimize edilmiş, 50 µl minimum kuyu kapasiteli, 384 kuyulu mikrolaka. Tüm numune temas yüzeyleri için düşük DNA bağlamalı ve ışık engelleyici özellikli siyah opak polistiren. Kuyu boyutları, VeriSeq NIPT Microlab STAR otomatik aspirasyon ve dağıtım adımları ile uyumlu sıvı seviyeleri oluşturur. Plaka yükseklik boyutları, VeriSeq NIPT Microlab STAR'ın otomatik hareketleri ile uyumludur. Sabit, düz yüzey yapıştırma ile gereken konuma plaka barkodlarının yerleştirilmesine olanak sağlayan plaka eteği. 	<p>Genel laboratuvar tedarikçisi</p> <p>Uyumlu plakalar:</p> <ul style="list-style-type: none"> Corning, ürün no 3820
<p>Aşağıdaki spesifikasyonlara sahip 96 kuyulu plaka:</p> <ul style="list-style-type: none"> 150 µl minimum kuyu kapasiteli; konik tabanlı, yüksek kenarlı 96 saydam kuyu ve minimum 5600 × g kapasiteyle torca dirençli çerçeve içeren mikrolaka. Tüm numune temas yüzeyleri için düşük DNA bağlamalı, RNaz/DNaz içermeyen polipropilen. Kuyu boyutları VeriSeq NIPT Microlab STAR otomatik aspirasyon ve dağıtım adımları ile uyumlu sıvı seviyeleri oluşturur. Plaka yükseklik boyutları, VeriSeq NIPT Microlab STAR'ın otomatik hareketleri ile uyumludur. <p>NOT: Farklı üreticilerden tedarik edilen uyumlu 96 kuyulu plakalar gibi farklı parça numaralarına sahip uyumlu plastik malzemeler, Illumina servis ve destek personeli VeriSeq NIPT Microlab STAR sisteminin parçaya özgü kalibrasyonunu gerçekleştirmeden, doğrudan birbirinin yerine kullanılamaz. Plastik malzemeler arasında geçiş yapmak için Illumina destek ekibinize danışın.</p> <ul style="list-style-type: none"> Sabit, düz yüzey yapıştırma ile gereken konuma plaka barkodlarının yerleştirilmesine olanak sağlayan plaka eteği. Denşirme için termal döngüleyiciler ile uyumludur. 	<p>Genel laboratuvar tedarikçisi</p> <p>Uyumlu plakalar:</p> <ul style="list-style-type: none"> Eppendorf, parça no 0030129512 Eppendorf, parça no 30129580 Eppendorf, parça no 30129598 Eppendorf, parça no 30129660 Eppendorf, parça no 30129679 BioRad, parça no HSP9601
<p>Aşağıdaki kapaklardan biri:</p> <ul style="list-style-type: none"> Microseal 'F' Folyo Folyo kapaklar 	<p>Bio-Rad, katalog no MSF1001</p> <p>Beckman Coulter, parça no 538619</p>

Sarf Malzemesi	Tedarikçi
Cell-Free DNA BCT CE	Streck, katalog no 218997
İtmeli Kapaklar	Sarstedt, sipariş no 65.802
2 ml vidalı kapaklı tüpler	Genel laboratuvar tedarikçisi
20 µl pipetleyici için 20 µl filtre uçları	Genel laboratuvar tedarikçisi
200 µl pipetleyici için 200 µl filtre uçları	Genel laboratuvar tedarikçisi
1000 µl pipetleyici için 1000 µl filtre uçları	Genel laboratuvar tedarikçisi
Eşdeğeri:	Genel laboratuvar tedarikçisi
<ul style="list-style-type: none"> Alkol bazlı hızlı dezenfektan sprey Dezenfektan deterjan çözeltisi 	
Tavsiye edilen:	
<ul style="list-style-type: none"> Deiyonize su ve %70 etanol 	

İsteğe Bağlı Materyaller (Temin Edilmeyen)

Sarf Malzemesi	Tedarikçi
Şablonsuz kontrol (NTC) için Dulbecco Fosfat Tamponlu Salin (DPBS)	Genel laboratuvar tedarikçisi
Tüp, vida kapaklı, 10 ml (yalnızca kontrol numuneleri için)	Sarstedt, sipariş no 60.551
Tüp, vida kapaklı, 50 ml	Genel laboratuvar tedarikçisi
25 ml serolojik pipetler	Genel laboratuvar tedarikçisi
10 ml serolojik pipetler	Genel laboratuvar tedarikçisi

Numune Toplanması, Nakliyesi ve Depolaması



DİKKAT

Tüm numuneleri potansiyel olarak bulaşıcı maddelermiş gibi taşıyın.

- 7–10 ml tam kan numuneleri Streck Cell-Free DNA BCT’de toplanmalıdır. Dondurmayın.
- Tam kanın taşınması, etiyolojik maddelerin taşınmasına yönelik yürürlükteki tüm yönetmeliklere uygun olmalıdır. Hızlandırılmış nakliye/taşıma yöntemlerinin kullanılması önerilir.
- Taşıma sırasında 4 °C ila 30 °C’de depolayın. Numuneler teslim alındıktan sonra işlemeye hazır oluncaya dek numuneleri 2 °C ila 8 °C’de depolayın. Kan toplama ve ilk plazma izolasyonu arasındaki süre 5 günü aşmamalıdır.
- Yeniden testin gerekli olduğu durumlarda, işleme sonrası numuneler kapatılıp ek olarak 5 gün süreyle 4 °C’de depolanabilir (kan toplama işleminden sonra toplamda en fazla 10 gün).



DİKKAT

Yukarıda belirtilen aralıkların üzerindeki sıcaklıklara maruziyet durumunda bireysel numune başarısızlığı oranları ve/veya numune performansı olumsuz etkilenebilir.

Uyarılar ve Tedbirler

- Bu test Proteinaz K içerir. Solunması, yutulması, ciltle ve gözle teması halinde kişisel yaralanmaya neden olabilir. İyi havalandırılan bir alanda kullanın, koruyucu kıyafet giyin, tozu solumaktan kaçının ve tüm kapları ve kullanılmayan içerikleri yürürlükteki resmi güvenlik standartları uyarınca bertaraf edin.
- Bu test guanidinyum klorür içerir. Solunması, yutulması, ciltle ve gözle teması halinde kişisel yaralanmaya neden olabilir. İyi havalandırılan bir alanda kullanın, koruyucu kıyafet giyin ve tüm kapları ve kullanılmayan içerikleri yürürlükteki yerel resmi güvenlik standartları uyarınca bertaraf edin.
- Bu test alevlenebilir bir kimyasal olan 2-propanol içerir. Isıdan ve açık alevden uzak tutun. Solunması, yutulması, ciltle ve gözle teması halinde kişisel yaralanmaya neden olabilir. İyi havalandırılan bir alanda kullanın, koruyucu kıyafet giyin ve tüm kapları ve kullanılmayan içerikleri yürürlükteki yerel resmi güvenlik standartları uyarınca bertaraf edin.
- Bu test, korozyona ve tutuşmaya neden olabilen bir sıvı olan dimetil sülfoksit içerir. Solunması, yutulması, ciltle ve gözle teması halinde kişisel yaralanmaya neden olabilir. İyi havalandırılan bir alanda kullanın, koruyucu kıyafet giyin ve tüm kapları ve kullanılmayan içerikleri yürürlükteki yerel resmi güvenlik standartları uyarınca bertaraf edin.
- Zararlı gazların oluşmasını önlemek için cfDNA ekstraksiyon atıklarını (guanidin hidroklorür içerir) ağartıcı içeren atıklarla (sodyum hipoklorit) atmayın.
- Tüm numuneleri potansiyel olarak bulaşıcı maddeler içeriyormuş gibi taşıyın.
- Rutin laboratuvar tedbirlerini uygulayın. Ağızınızla pipetlemeyin. Belirlenmiş çalışma alanlarında yemek yemeyin, içecek tüketmeyin veya sigara içmeyin. Numuneleri ve test reaktiflerini kullanırken tek kullanımlık eldiven takın ve laboratuvar önlüğü giyin. Numuneleri ve test reaktiflerini elledikten sonra ellerinizi iyice yıkayın.
- Test bileşenlerini test kutusu etiketinde belirtilen son kullanma tarihlerinden sonra kullanmayın. Test bileşenlerini farklı test lotlarındaki bileşenlerle değiştirmeyin. Test lotları test kutusu etiketinde tanımlanmıştır. Test bileşenlerini belirtilen sıcaklıkta saklayın.
- Numune veya reaktif bozunmasını önlemek için temizlikten kaynaklanan tüm sodyum hipoklorit buharlarının protokol başlamadan önce tamamen dağıtıldığından emin olun.
- Belirtilen prosedürlerin uygulanmaması hatalı sonuçlara veya numune kalitesinde belirgin azalmaya neden olabilir.
- Bu ürünle ilgili olarak ortaya çıkan tüm ciddi olayları derhal Illumina'ya ve kullanıcının ve hastanın bulunduğu üye devletlerin Yetkili Makamlarına raporlayın.

- Çevre, sağlık ve güvenlik bilgileri için support.illumina.com/sds.html adresindeki güvenlik veri sayfalarına (SDS) bakın.

Prosedür Notları

Kontaminasyonun Önlenmesi

- Yeni uçlar ve yeni laboratuvar sarf malzemeleri kullanın.
- Taşınma ve numuneler arası çapraz kontaminasyon riskini azaltmak için aerosole dayanıklı uçlar kullanın.
- Kontaminasyon olasılığı nedeniyle, kuyu içeriklerinin tamamen kuyuda kaldığından emin olmak için son derece dikkatli olun. İçerikleri sıçratmayın. Her vorteks adımının ardından santrifüj uygulayın.
- Kan ve kan türevleri kullanırken, doğru laboratuvar uygulamalarına ve hijyenle ilgili yürürlükteki yönetmeliklere uyun.
- Kütüphane hazırlama sırasında aerosol ağartıcı spreyler kullanmayın. Eser miktarda ağartıcı kontaminasyonu testin başarısız olmasına neden olabilir.
- Herhangi bir plakayı açarken plakayı sıkıca kavrayarak sağlam ve düz bir yüzeye yerleştirmeye dikkat edin. Kapağın açığa çıkan kuyularla temas etmemesine özen göstererek kapağı yavaşça çıkarın. Açığa çıkan kuyulara dokunmamaya veya içerikleri bozmamaya dikkat edin. Kuyular arası çapraz kontaminasyon, hatalı sonuçlar üretilmesine neden olabilir.

VeriSeq NIPT Microlab STAR Tabla Temizliği

- Tablayı kullanmadan önce temiz olup olmadığını kontrol edin. En az haftada bir kez haftalık bakım gerçekleştirin ve burada belirtilen temizlik talimatlarını izleyin.
- Boşaltılmayan tüm taşıyıcıları çıkarın ve alkol bazlı hızlı dezenfektan spreyi, deiyonize su ve %70 etanol ile temizleyip kurumaya bırakın. Fazla kirlenmişlerse daha sonra dezenfektan deterjanı çözeltisine batırın, alkol bazlı dezenfektanla durulayın ve kurumaya bırakın.
- Ön kapağı açıp tablayı deiyonize su ve %70 etanolle ıslatılmış bir bezle silin. Özellikle kaydırma bloklarının temizliği kontrol edilmelidir.
- Temel Vakum Sistemi (BVS) manifoldunu çıkarın ve BVS manifoldunu, contasını ve iç haznelerini bezle temizleyin. Malzemenin kırılma riskine gelmesine neden olabileceğinden contayı etanol ile temizlemekten kaçının.
- CORE 96 başlı için uç atık kutusunu ve bağımsız kanalı boşaltın.
- Atık uç istasyonunun bağımsız kanal uç çıkarma plakasını sökün ve temizleyin: Yüzeye doğrudan deiyonize su ve %70 etanol püskürtün ve silin. Çerçeve üzerine yeni bir plastik torba çekin ve yeniden tutturun. Temiz uç çıkarma plakasını yerine geri koyun.

- CORE 96 başlı atık kutusunun ve kanalın yüzeyine doğrudan deiyonize su ve %70 etanol püskürtün ve silerek temizleyin.
 - Birikmenin uç atıklarından giderilmesi zorsa birikme giderilene dek DNaz/RNaz içermeyen su ile ıslatılmış bir bez ile silin. Bezi uygun şekilde bertaraf edin. Alkol bazlı dezenfektan ile sterilizasyon işlemine geçin.
- Tiftiksiz bir bezi veya pamuklu çubuğu %70 etanolle ıslatın. Barkod okuyucunun lazer tarayıcı penceresini çubukla temizleyin. Aynı bezi veya çubuğu kullanarak CPAC plaka adaptörünün her bir kuyusunu temizleyin. Bez kullanıyorsanız kuyunun iç kısmının düzgün temizlendiğinden emin olmak için bir kalemin arkasını kullanarak adaptörün her bir kuyusuna bezi bastırın.
- Bağımsız kanalları temizleyin:
 - Bağımsız kanallarda uç çıkarma manşonunu (pipetleme kanallarının dış kısmı) deiyonize su ve %70 etanolle ıslatılmış tiftiksiz bir bezle temizleyin. (Bkz. *Hamilton Microlab STAR Referans Kılavuzu no 15070074.*)
 - Durdurma diskini ve pipetleme başının O halkalarını (pipetleme kanallarının dış kısmı) deiyonize su ve %70 etanolle ıslatılmış tiftiksiz bir bezle temizleyin.
- CORE 96 başlı atık kutusunu temizleyin:
 - Deiyonize su ve %70 etanolle ıslatılmış aynı tiftiksiz bezi kullanarak 96 başlı kutunun muhafazasını ve durdurma disklerinin alt kısmını temizleyin.
 - Aynı bezi veya deiyonize su ve %70 etanolle ıslatılmış bezden yırtılmış bir şerit parçayı kullanarak bezi 96 başlı kutunun pipet kanallarının yanlarından “ip gibi geçirerek” O halkalarını temizleyin. Bu prosedürü 96 başlı kutunun tüm pipet kanalları için tekrarlayın.
- Ön ve yan kapağa deiyonize su ve %70 etanol püskürtün ve silerek kurulaşın.
- Otomatik yükleme koruma bandını deiyonize su ve %70 etanolle ıslatılmış bir bezle temizleyin ve basınç uygulamadan silin.
- Tabla ve bileşenler tamamen kurduğunda taşıyıcıları değiştirin.

NOT ML STAR'ın hatalı temizliği veya bakımı çapraz kontaminasyona veya kötü test performansına neden olabilir.

Kalite Kontrol

Bilinen performans özelliklerine sahip kontrol malzemesi, laboratuvardaki işleme ve teknik prosedürlerdeki farklılıkları tespit etmek için değerlendirilebilir.

Bir kontrol numunesinin veya şablonsuz kontrolün çalıştırılması her bir numune hazırlamayla işlenebilecek bilinmeyen maternal numunelerin toplam sayısını azaltır.

24 veya 48 numunelik her bir seri için iki NTC numunesini ve 96 numunelik her bir seri için dört NTC numunesini aşmayın.

Kullanım Talimatları

İpuçları ve Teknikler

Protokolde güvenli durma noktası belirtilmediği sürece derhal bir sonraki adıma devam edin.

Plakaların Barkodlanması

- PL ile başlayan tam etekli plakalar için barkodlar.
- DW ile başlayan derin kuyulu plakalar için barkodlar.
- Tam etekli plakalar ve derin kuyulu plakalar için barkodları 12. sütunun yanındaki tarafa yapıştırın.
- Otomatik taramayı etkinleştirmek için plakaları barkod sağ tarafa bakacak şekilde yükleyin.

Plakayı Kapatma ve Açma

- Çapraz kontaminasyonu önlemek için son derece dikkatli olun; kapağın alt kısmında görünür sıvı olmamalıdır.
 - Kapağın açığa çıkan alt kısmının, açığa çıkan kuyularla temas etmediğinden emin olun.
 - Açığa çıkan kuyulara temas etmemeye özen gösterin.
- Protokoldeki aşağıda verilen adımlardan önce 96 kuyulu plakayı daima kapatın:
 - Santrifüj adımları
 - Termal döngüleme adımları
- Plakayı kapatmak için plakaya folyo kapağı yapıştırın ve daha sonra kapatın. Basıncın tüm plaka geneline uygulandığından ve kapağın her bir kuyu için sıkı olduğundan emin olun.
- Plakayı kapatmadan önce şunları yapın:
 - 96 kuyulu plakayı 20 saniye boyunca 1000 x g ile kısa süre santrifüjleyin.
 - Plakayı düz bir yüzeye yerleştirin ve ardından kapağı yavaşça çıkarın.

VeriSeq NIPT Microlab STAR

- Kullanmadan önce, üretici talimatlarına göre gerekli bakımı gerçekleştirin ve belgeleyin.
- Otomatik adımlar sırasında ML STAR'ı gözlemleyin. İstemler ve kullanıcı talimatları için VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 Software arayüzünü takip edin.
- Çalışma sırasında ön kapağı yerinde tutun.
- Çalışma sırasında tüm nesnelere tabladan uzak tutun.
- Hata işleme olayı sırasında **Exclude** (Hariç Tut) düğmesi seçenek olarak sunulursa hiçbir durumda bu seçeneği belirlemeyin. Yöntem, hata işleme olayını geçemiyorsa ve sınırlı hata işleme seçeneğiniz varsa çalıştırmayı iptal edin.
- Plaka vakumu adımları sırasında VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 tarafından istem belirtilmesi durumunda plaka ve vakum manifoldu arasında sızdırmazlık sağlamak için manuel olarak destek olun.

- Sistemin adaptörden uçları otomatik olarak atmasını bekleyin. Yazılım tarafından istem belirtilmediği sürece uçları manuel olarak çıkarmayın.
- Kullanılan reaktifleri ve sarf malzemelerini Workflow Manager tarafından bildirildiği şekilde çıkarın.
- Vakum atık damacanelerini her gün boşaltın. İlk damacana asla ½ dolu seviyeyi aşmamalıdır. Vakum atığının fazla akışı, vakum pompasının hasar görmesine ve uygulanan sistem vakumunun azalmasına neden olabilir.
- 24, 48 ve 96 numunelik seriler için, yöntemi başlatmadan önce ayrı ayrı sayılmış 8 kanallı uçlarla dolu bir rafı yükleyin.

Numuneleri İşleme

Prosedür

1. Her bir alikot için şu adımları tamamlayın:
 - a. Barkodlanmış numuneleri 1600 x g ile 10 dakika boyunca 4 °C'de fren kapalı olarak santrifüjleyin.
 - b. Santrifüj tamamen durduğunda numune tüplerini çıkarın.Santrifüj işleminden sonra 15 dakika içerisinde plazma izolasyonuna başlayın. 15 dakikadan uzun süre geçerse tekrar santrifüjleyin.
2. Aşağıdaki gereklilikleri doğrulayarak her tüpü numune uygunluğu açısından inceleyin:
 - Numune hacmi beklendiği şekildedir.
 - Numunelerin kırmızı kan hücresi ve plazma katmanları arasındaki net ayrım, santrifüjden sonra görünür durumdadır.
 - Plazma düzeyi, beyaz kan hücresi tabakasının en az 1,5 ml üzerindedir.
 - Numune yoğun şekilde hemolize değildir (yani, plazma koyu kırmızı görünmüyor).
 - Numune lipemik değildir (ör. plazma bulanık beyaz veya bulanık opak görünmüyor).
 - Numunede pıhtılaşma yoktur.



DİKKAT

Hatalı şekilde depolanan veya taşınan numuneler uygunluğunu kaybedebilir. İş akışı boyunca uygun olmayan numunelerin işlenmesi halinde bu numuneler ekstraksiyonlar sırasında bağlama plakasını tıkayarak bitişik kuyulara numune aşırı akışı olmasına yol açabilir.

3. Tüplerin kapaklarını açın ve tüpleri, tüp taşıyıcılara yerleştirin. Seri için tüm numuneleri ve tüm plazma kontrollerini yükleyin.



DİKKAT

Bir hata işleme olayı sırasında Exclude (Hariç Tut) seçeneği belirtilirse bunu seçmeyin. Yöntem, hata işleme olayını geçemiyorsa ve sınırlı hata işleme seçeneğiniz varsa çalıştırmayı iptal edin.

Plazma İzolasyonu

Hazırlık

- 1 derin kuyulu plakayı Ara Plazma olarak etiketleyin ve barkod yapıştırın.
- 1 derin kuyulu plakayı Nihai Plazma olarak etiketleyin ve barkod yapıştırın.
- 24, 48 ve 96 numunelik seriler için, yöntemi başlatmadan önce ayrı ayrı sayılmış 8 kanallı uçlarla dolu bir rafı yükleyin.



DİKKAT

Ara Plazma ve Nihai Plazma plakaları için doğru plaka türünün kullanıldığından emin olun. Derin kuyu plakası yerine derin kuyu haznesi kullanılması numune karışmasına neden olur ve hatalı sonuçlar elde edilmesine yol açabilir.

Prosedür

1. AppLauncher uygulamasını açıp **VeriSeq NIPT Method** (VeriSeq NIPT Yöntemi) ögesini seçin.
2. Benzersiz bir seri numarası ve kullanıcı adı girin ve ardından **OK** (Tamam) ögesini seçin.
Seri Numarası ≤ 26 karakter içerebilir. Yalnızca sayı, harf, alt çizgi (_) ve tire (-) kullanabilirsiniz. Örneğin: 2025-10-16_Seri3.
Seri Numarası büyük/küçük harfe duyarlı değildir. Büyük/küçük harfe duyarlı Seri Numaraları benzersiz olarak kabul edilmez.
Seri adları benzersiz olmalıdır ve yalnızca büyük/küçük harf bakımından farklılık göstermemelidir. Örneğin Seri01 ve seri01 şeklindeki seri adları benzersiz değildir. Aynı kural Numune Numarası adlandırmasında da geçerlidir.
3. **New Batch** (Yeni Seri) ögesini seçin.
4. Başlatma işleminin ardından plazma izolasyonunu başlatmak için **OK** (Tamam) ögesini seçin.
5. Seri boyutunu seçin ve ardından **OK** (Tamam) ögesini seçin.
6. Şablonsuz kontrollerin (NTC) sayısını seçin ve ardından **OK** (Tamam) ögesini seçin.
NTC yuvaları her zaman son seçilen yuvalar olmalıdır. Örneğin, iki NTC içeren 24 numunelik bir çalıştırmada 23. ve 24. konumlar NTC'dir.
7. Aşağıdaki adımlardan birini gerçekleştirin:
 - Mevcut bir numune sayfasını yüklemek için seriyle ilişkili numune sayfasını seçin ve ardından **OK** (Tamam) ögesini seçin.
 - Numune sayfası seçmeden devam etmek için **No Sample Sheet** (Numune Sayfası Yok) ögesini seçin.
Numune sayfası oluşturma hakkında bilgi için bkz. *VeriSeq NIPT Solution v2 Software Kılavuzu (belge no 1000000067940)*.

NOT Uygun veri analizinin sağlanması için her bir numuneye ilişkin numune türü (tekil veya ikiz) doğru şekilde kaydedilmelidir. **No Sample Sheet** (Numune Sayfası Yok) seçeneğini belirlerseniz Workflow Manager Service Tools (Servis Araçları) bölümünde varsayılan numune değerlerini ayarladığınızdan emin olun. Daha fazla bilgi için bkz. *VeriSeq NIPT Solution v2 Software Kılavuzu (belge no 1000000067940)*.

8. Tüm barkodların yapıştırılmış olduğunu teyit edin ve ardından numuneleri, uçları ve plakaları (barkod sağa dönük şekilde) taşıyıcıya yükleyin.
9. Her yükleme isteminden sonra **OK** (Tamam) ögesini seçin.

Numune Serisi Boyutu	Taşıyıcı Türü	İzleme	Kalem	Bölge Konumu
24, 48, 96	Uç	7–12	1000 µl uçlar	5
			1000 µl uçlar (yalnızca 96'lı seri)	4, 5
	Tüp	15	Hazırlanan kan numunesi tüpleri 1–24 (tüm seri boyutları için)	1–24
	Tüp	16	Hazırlanan kan numunesi tüpleri 25–48 (yalnızca 48 ve 96'lı seri boyutları için)	25–48
	Tüp	17	Hazırlanan kan numunesi tüpleri 49–72 (yalnızca 96'lı seri boyutları için)	49–72
	Tüp	18	Hazırlanan kan numunesi tüpleri 73–96 (yalnızca 96'lı seri boyutları için)	73–96
	Multiflex	19–24	Boş derin kuyulu plaka, Nihai Plazma - barkodlu	4
	Multiflex	19–24	Boş derin kuyulu plaka, Ara Plazma - barkodlu	5
	Reaktif	47	[İsteğe Bağlı] Dulbecco'nun Fosfat Tamponlu Salini (DPBS) - şablonsuz kontrol (NTC) için kullanılır	5

10. Taşıyıcıların, laboratuvar donanımının ve reaktiflerin doğru şekilde yüklendiğinden emin olun.
11. Pre-Spin Deck Verification (Döndürme Öncesi Tabla Doğrulama) ekranında **OK** (Tamam) ögesini seçin.
12. Otomatik adımlar gerçekleştirirken ML STAR'ı gözlemleyin.
13. Workflow Manager tarafından istem verildiğinde ML STAR yükleme tablasında ML STAR'ın taşıyıcıları boşaltması için hiçbir engel bulunmadığından emin olun.
14. Tablayı boşaltmak için **Unload** (Boşalt) ögesini seçin.
15. Ara Plazma derin kuyulu plakasını çıkarın.
 - a. Her bir kuyuda tutarlı hacimler olup olmadığı açısından plakayı inceleyin (pipet hatası olmamalıdır). Beklenen hacim 1000 µl'dir.
 - b. Tüm tutarsızlıkları not edin ve Plazma İzolasyonu işlemi tamamlandığında bunları kaydedin.

- c. Plakayı kapatın, dengeli bir şekilde yükleyin ve 5600 x g ile 10 dakika boyunca fren kapalı olarak veya en düşük ayardayken santrifüjleyin.

16. Nihai Plazma Hazırlamaya geçmek için **Yes** (Evet) ögesini seçin.
17. Plaka kapağını açın ve plakayı tekrar taşıyıcıya yükleyin.

Numune Serisi Boyutu	Taşıyıcı Türü	İzleme	Kalem	Bölge Konumu
24, 48, 96	Multiflex	19–24	Ara Plazma derin kuyulu plakası	5

18. **Intermediate Plasma plate has been spun** (Ara Plazma plakası döndürüldü) onay kutusunu seçin ve **OK** (Tamam) ögesini seçin.
19. Otomatik adımlar gerçekleştirirken ML STAR'ı gözlemleyin.
20. Workflow Manager tarafından istem verildiğinde ML STAR yükleme tablasında ML STAR'ın taşıyıcıları boşaltması için hiçbir engel bulunmadığından emin olun.
21. Tablayı boşaltmak için **Unload** (Boşalt) ögesini seçin.
22. Workflow Manager tarafından istem verildiğinde taşıyıcıları ve tablayı boşaltın.
23. Nihai Plazma derin kuyulu plakasını çıkarın.
24. Aşağıdakiler bakımından plakayı görsel olarak inceleyin:

- Her bir kuyuda tutarlı hacimler olduğu. Beklenen hacmin 900 µl olduğu.
- Görünür hücre tanecikleri.
- Aşırı hemoliz.

Anormal görünür hücre tanecikleri veya aşırı hemoliz gözlemlerseniz Plazma İzolasyonu yönteminin sonunda etkilenen numuneyi geçersiz kılın veya Batch Manager'ı kullanın. Batch Manager hakkında daha fazla bilgi için bkz. *VeriSeq NIPT Solution v2 Software Kılavuzu (belge no 1000000067940)*.

25. Workflow Manager tarafından istem verildiğinde **OK** (Tamam) ögesini seçin.
26. Etkilenen kuyular hakkındaki yorumları girin ve ardından **OK** (Tamam) ögesini seçin.
27. Aşağıdaki adımlardan birini gerçekleştirin.
- cfDNA Ekstraksiyonuna geçmek için **Yes** (Evet) ögesini seçin.
 - Durdurmak için **Exit** (Çıkış) ögesini seçin.

GÜVENLİ DURMA NOKTASI

Çalışmayı durduruyorsanız Nihai Plazma plakasını kapatın ve 2 °C ila 8 °C'de maksimum 7 gün boyunca saklayın.

cfDNA Ekstraksiyonu

Hazırlık

1. Kitin son kullanım tarihinin geçmediğini doğrulamak için Extraction ve Accessory Box'ları görsel olarak inceleyin.
2. Aşağıdaki reaktifleri hazırlayın. Hazne tüplerini ve derin kuyulu hazneleri reaktiflerin adlarıyla etiketleyin.

Reaktif	Depolama	Talimatlar
Nihai Plazma derin kuyu plakası	2 °C ila 8 °C	Daha önce depolanmışsa oda sıcaklığına gelmesi için 30 dakika bekletin. 1000 x g ile 20 saniye boyunca santrifüjleyin. Kullanmadan önce Nihai Plazma derin kuyulu plakasını açın.

3. 3,75 ml Proteinaz Tamponunu, her bir Proteinaz K reaktif flakonuna yavaşça ekleyin.
 - 24 ve 48 numune için 3 flakon hazırlayın.
 - 96 numune için 4 flakon hazırlayın.
4. Proteinaz K flakonlarını kapatın ve tekrar süspansiyon olana dek vorteksleyin.



DİKKAT

Kauçuk tapayı kontamine etmeyin. Kauçuk tapaya başka maddelerin bulaşması daha sonraki numunelerin kontamine olmasına neden olabilir.

5. Hazırlanan Proteinaz K'yı tüm flakonlardan bir reaktif tüpüne havuzlayın ve Proteinaz K olarak etiketleyin.
6. Her bir Yıkama Tamponu II reaktif şişesine 100 ml %100 EtOH ekleyin.
 - 24 ve 48 numune için 1 şişe hazırlayın.
 - 96 numune için 2 şişe hazırlayın.
7. Yıkama Tamponu II şişelerini ters çevirerek karıştırın.
8. Yıkama Tamponu II şişelerindeki onay kutularını işaretleyin.
9. 1 yeni tam etekli plakayı Ara olarak etiketleyin ve bir plaka barkodu yapıştırın.
10. 1 yeni tam etekli plakayı cfDNA Elüsyonu olarak etiketleyin ve bir plaka barkodu yapıştırın.
11. 1 yeni derin kuyulu plakayı Ekstraksiyon Ara olarak etiketleyin ve bir derin kuyulu plaka barkodu yapıştırın.
12. DNA Bağlama plakasına bir plaka barkodu yapıştırın.
13. 24 ve 48 numune serisi için kullanılmayan kuyulara bir folyo kapak takın.
14. Vakum sisteminin temizliği için %70 EtOH temizleme çözeltisi (%70 EtOH, %30 DNaz/RNaz içermeyen su) hazırlayın.

15. Vakum sistemini aşağıdaki şekilde hazırlayın.

- Vakum manifoldunu çıkarın ve %70 EtOH ile temizleyin.
Malzemenin kırılma riskine neden olabileceğinden contayı EtOH ile temizlemekten kaçınınız.
- Vakum atığını boşaltın.
- ML STAR vakum sisteminin açık olduğundan emin olun.

Prosedür

- cfDNA Ekstraksiyonu başlatmak için **OK** (Tamam) ögesini seçin.
- VeriSeq NIPT Method** (VeriSeq NIPT Yöntemi) açık değilse:
 - AppLauncher uygulamasını açıp **VeriSeq NIPT Method** (VeriSeq NIPT Yöntemi) ögesini seçin.
 - Seri Numarasını ve kullanıcı adını girip **OK** (Tamam) ögesini seçin.
- Uçları aşağıdaki gibi uç taşıyıcılarına yükleyin ve ardından **OK** (Tamam) ögesini seçin.



DİKKAT

24, 48 ve 96 numunelik seriler için yöntemi başlatmadan önce tamamı 8 kanallı uçlarla dolu raf ekleyin.

Numune Serisi Boyutu	Taşıyıcı Türü	İzleme	Kalem	Bölge Konumu
24	Uç	1-6	1000 µl uçlar	1
		7-12	300 µl uçlar	1
48	Uç	1-6	1000 µl uçlar	1, 2
		7-12	300 µl uçlar	1
96	Uç	1-6	1000 µl uçlar	1, 2, 3, 4
		7-12	300 µl uçlar	1

4. Sayılı uçları aşağıdaki gibi uç taşıyıcısına yükleyin.

Numune Serisi Boyutu	Taşıyıcı Türü	İzleme	Kalem	Bölge Konumu
24, 48, 96	Uç	49-54	1000 µl uçlar	1
			300 µl uçlar	2
			50 µl uçlar	3

5. Her bir uç rafı için ilk ve son ucun konumunu girin ve ardından **OK** (Tamam) ögesini seçin.

6. Extraction Box barkodlarını tarayın.
7. Kullanıcı adını veya reaktifi hazırlayan kişinin baş harflerini girin ve ardından **OK** (Tamam) ögesini seçin.
8. Accessory Box barkodlarını tarayın.
9. Kullanıcı adını veya reaktifi hazırlayan kişinin baş harflerini girin ve ardından **OK** (Tamam) ögesini seçin.
10. Barkodların yapıştırıldığını teyit edin.
11. Gerekliyse Nihai Plazma derin kuyulu plakasını açın.
12. Plakaları aşağıdaki gibi (barkod sağa dönük olarak) plaka taşıyıcısına yükleyin ve ardından **OK** (Tamam) ögesini seçin.

Numune Serisi Boyutu	Taşıyıcı Türü	İzleme	Kalem	Bölge Konumu
24, 48, 96	Multiflex	19–24	Yeni tam etekli plaka, Ara - barkodlu	1
			Yeni tam etekli plaka, cfDNA Elüsyonu - barkodlu	2
			Yeni derin kuyulu plaka, Ekstraksiyon Ara - barkodlu	4
			Nihai Plazma derin kuyulu plakası - barkodlu	5

13. DNA Bağlama plakasının barkodlu olduğunu teyit edin ve ardından **OK** (Tamam) ögesini seçin.
14. Kısmi plaka serileri için kullanılmayan kuyuların üzerine kesilmiş bir plaka kapağı takın (24 numuneli seriler için 4–12. sütunlar ve 48 numuneli seriler için 7–12. sütunlar).
15. DNA Bağlama plakasını vakum manifolduna barkod sağa bakacak şekilde yükleyin.
16. Bağlama plakasını BVS manifolduna yerleştirmeden önce olası tıkanıklıklar bakımından kuyuları görsel olarak inceleyin.
Tıkanıklık olması, vakum altında reaktiflerin akışını engelleyebilir.
17. 24 veya 48 numunelik seriler kullanılıyorsa kullanılmamış kuyuları kapatın ve folyo kapakla sızdırmaz hale getirin. **Are DNA Binding Plate Columns Sealed?** (DNA Bağlama Plakası Sütunları Kapalı mı?) onay kutusunu seçin ve **OK** (Tamam) ögesini seçin.
18. Reaktif tüplerini aşağıdaki gibi reaktif taşıyıcısına yükleyin ve ardından **OK** (Tamam) ögesini seçin.

Numune Serisi Boyutu	Taşıyıcı Türü	İzleme	Kalem	Bölge Konumu
24, 48	Reaktif	47	16 ml Elüsyon Tamponu	1
			11 ml Proteinaz K	2
96	Reaktif	47	16 ml Elüsyon Tamponu	1
			15 ml Proteinaz K	2

19. Belirtilen reaktifleri derin kuyulu haznelere aktarın ve ardından hazneleri aşağıdaki gibi derin kuyulu taşıyıcılara yükleyin.
20. **OK** (Tamam) ögesini seçin.

Numune Serisi Boyutu	Taşıyıcı Türü	İzleme	Kalem	Bölge Konumu
24, 48	Derin kuyulu	39–44	125 ml Yıkama Tamponu II	1
			125 ml Yıkama Tamponu I	2
			60 ml %100 EtOH	3
			100 ml Lizis Tamponu	4
			60 ml DNaz/RNaz içermeyen su	5
96	Derin kuyulu	39–44	200 ml Yıkama Tamponu II	1
			125 ml Yıkama Tamponu I	2
			100 ml %100 EtOH	3
			100 ml Lizis Tamponu	4
			100 ml DNaz/RNaz içermeyen su	5

21. Otomatik reaktif hacmi kontrolünün tamamlanmasını bekleyin.
22. Vakum atığının boş olduğunu teyit edin (yarı dolu olması tavsiye edilir) ve ardından **OK** (Tamam) ögesini seçin.
23. Tüm taşıyıcıların, laboratuvar donanımının ve reaktiflerin yerleşimini teyit edin ve ardından Extraction Deck Verification (Ekstraksiyon Tablası Doğrulama) ekranında **OK** (Tamam) ögesini seçin.
24. Otomatik adımlar sırasında ML STAR'ı gözlemleyin.



DİKKAT

Çevresindeki kuyular kontamine olmadan önce sistem tarafından tespit edilmeyen numune aşırı akışlarını manuel olarak geçersiz kılmanız gerekir.

25. Nihai vakum adımından sonra DNA Bağlama plakasını çıkarın ve taban yüzeyini %70 EtOH ile temizleyin.
26. DNA Bağlama plakasındaki kapatılmayan tüm kuyuları kapatın ve DNA Bağlama plakasını boş Nihai Plazma derin kuyulu plakasına yerleştirin.
27. DNA Bağlama plakası/Nihai Plazma plakası tertibatını fren açık olarak 5600 × g hızda 10 dakika boyunca santrifüjleyin.
28. **OK** (Tamam) ögesini seçin.
29. DNA Bağlama plakası santrifüjü sırasında vakum temizliğini tamamlayın:
- Vakum manifoldunu çıkarın ve ardından **OK** (Tamam) ögesini seçin.
 - Otomatik atık bertarafının tamamlanmasını bekleyin.

- c. Vakum manifoldunu ve vakum sisteminin içini %70 EtOH ile temizleyin ve ardından vakum manifoldunu değiştirin.
 - d. Vakum manifoldunda elüsyon plakası aktarımını başlatmak için **Manifold is on Vacuum** (Manifold Vakumda) onay kutusunu seçin ve ardından **OK** (Tamam) ögesini seçin.
30. Santrifüj işleminden sonra DNA Bağlama plakasındaki numune içeren kuyuları açın.
 31. DNA Bağlama plakasını vakum manifoldundaki cfDNA Elüsyon plakasına yerleştirin.
 32. DNA Bağlama plakasını barkod sağa dönük olacak şekilde yükleyin ve ardından **OK** (Tamam) ögesini seçin.
 33. Otomatik adımlar sırasında ML STAR'ı gözlemleyin.
 34. İnkübasyon adımının ardından **Plates are assembled as indicated** (Plakalar belirtilen şekilde takıldı) onay kutusunu seçin. DNA Bağlama/cfDNA Elüsyon plakası tertibatının destek tabanı üzerinde olduğunu (santrifüj için gerekliyse) teyit edin.
 35. DNA Bağlama plakasındaki kapatılmayan tüm kuyuları kapatın.
 36. Fren açıkken 5600 x g ile 2 dakika santrifüjleyin ve ardından **OK** (Tamam) ögesini seçin.
 37. Görsel olarak her bir kuyudaki cfDNA Elüsyon plakasında uygun hacimler olduğunu inceleyin. Beklenen hacim yaklaşık 55 µl'dir.
 38. Kapatın ve kütüphane hazırlama için cfDNA Elüsyon plakasını tutun.
 39. Workflow Manager tarafından istem verildiğinde ML STAR yükleme tablasında ML STAR'ın taşıyıcıları boşaltması için hiçbir engel bulunmadığından emin olun.
 40. Tablayı boşaltmak için **Unload** (Boşalt) ögesini seçin.
 41. Tüm taşıyıcıları boşaltın ve ML STAR tablasını temizleyerek **OK** (Tamam) ögesini seçin.
 42. Etkilenen kuyular hakkındaki yorumları girin ve ardından **OK** (Tamam) ögesini seçin.
 43. Aşağıdaki adımlardan birini gerçekleştirin:
 - Kütüphaneleri Hazırlamaya devam etmek için **Yes** (Evet) ögesini seçin.
 - Durdurmak için **Exit** (Çıkış) ögesini seçin.

GÜVENLİ DURMA NOKTASI

Çalışmayı durduruyorsanız cfDNA Elüsyon plakasını kapatın ve en fazla 7 gün -25 °C ila -15 °C'de depolayın.

Kütüphaneleri Hazırlama

Hazırlık

1. Kitlerin son kullanım tarihinin geçmediğini onaylamak için Library Prep ve Accessory Box'ları görsel olarak inceleyin.
2. Aşağıdaki reaktifleri hazırlayın. Hazne tüplerini ve derin kuyulu hazneleri reaktif adlarıyla etiketleyin.

Reaktif	Depolama	Talimatlar
A-Tailing Mix (A-Kuyuklama Karışımı)	-25 °C ila -15 °C	Oda sıcaklığında çözünüz. Karıştırmak için vorteksleyin ve ardından kısa süre santrifüjleyin.
cfDNA Elüsyon Plakası (cfDNA Elüsyon Plakası)	-25 °C ila -15 °C	Daha önce depolanmışsa plakanın 7 günden fazla saklanmadığını teyit edin ve oda sıcaklığında çözünüz. 1 dakika boyunca 1500 rpm'de vorteksleyin. 1000 x g ile 20 saniye boyunca santrifüjleyin.
End Repair Mix (Uç Onarım Karışımı)	-25 °C ila -15 °C	Oda sıcaklığında çözünüz. Karıştırmak için vorteksleyin.
Hybridization Buffer (Hibridizasyon Tamponu)	-25 °C ila -15 °C	Oda sıcaklığında çözünüz. Karıştırmak için vorteksleyin. Kullandıktan sonra tekrar depolayın.
Ligation Mix (Bağlama Karışımı)	-25 °C ila -15 °C	Oda sıcaklığında çözünüz. Karıştırmak için vorteksleyin ve ardından kısa süre santrifüjleyin.
NIPT DNA Adapter Plate (NIPT DNA Adaptörü Plakası)	-25 °C ila -15 °C	Oda sıcaklığında çözünüz. Karıştırmak için vorteksleyin. 1000 x g ile 20 saniye boyunca santrifüjleyin.
Resuspension Buffer (Yeniden Askıya Alma Tamponu)	2 °C ila 8 °C	Karıştırmak için vorteksleyin. Kullandıktan sonra tekrar depolayın.
Sample Purification Beads (Numune Saflaştırma Boncukları)	2 °C ila 8 °C	Oda sıcaklığına gelmesi için 30 dakika bekletin. Her kullanımdan önce kuvvetlice vorteksleyin. Tüm boncuklar süspansiyonda ve karışım homojen oluncaya kadar vorteksleyerek veya ters yüz ederek karıştırın.



DİKKAT

NIPT DNA adaptörü plakasını açarken kuyular arası aerosol çapraz kontaminasyonunu engellemek için son derece dikkatli olun. Aksi halde, hatalı sonuçlar elde edilebilir.

3. cfDNA Elüsyon plakası dondurulmuş olarak depolanmışsa aşağıda belirtildiği şekilde hazırlayın.
 - a. Oda sıcaklığında çözünüz.
 - b. 1 dakika boyunca 1500 rpm'de vorteksleyin.

- c. 1000 x g ile 20 saniye boyunca santrifüjleyin.
4. Bir yeni tam etekli plakayı Kütüphaneler olarak etiketleyin ve bir plaka barkodu yapıştırın.
5. Mutlak EtOH'den %80 EtOH hazırlayın. 40 ml %100 EtOH ve 10 ml DNaz/RNaz içermeyen suyu birleştirin. Karıştırmak için ters çevirin.
6. ML STAR termal kontrolünün açık olduğundan emin olun.

Enzimleri Seyreltme

1. A-Kuyruklama Karışımı ve Yeniden Askıya Alma Tamponunu vidalı kapaklı bir tüpte birleştirin. Karıştırmak için vorteksleyin ve ardından kısa süre santrifüjleyin.

Numune Serisi Boyutu	A-Kuyruklama Karışımı (µl)	Yeniden Askıya Alma Tamponu (µl)
24, 48	900	1200
96	1800	2400

2. Bağlama Karışımı ve Yeniden Askıya Alma Tamponunu vidalı kapaklı bir tüpte birleştirin. Karıştırmak için vorteksleyin ve ardından kısa süre santrifüjleyin.

Numune Serisi Boyutu	Bağlama Karışımı (µl)	Yeniden Askıya Alma Tamponu (µl)
24, 48	230	1713
96	440	3278

Prosedür

1. Kütüphane Hazırlamayı başlatmak için **OK** (Tamam) ögesini seçin. **VeriSeq NIPT Method** (VeriSeq NIPT Yöntemi) halihazırda açık değilse:
 - a. AppLauncher uygulamasını açın ve **VeriSeq NIPT Method** (VeriSeq NIPT Yöntemi) ögesini seçin.
 - b. Seri Numarasını ve kullanıcı adını girip **OK** (Tamam) ögesini seçin.
2. Aşağıdaki sarf malzemelerinin Reagent Preparation (Reaktif Hazırlama) ekranında belirtildiği gibi hazırlandığını teyit edin:
 - A-Kuyruklama Karışımı, Bağlama Karışımı ve %80 EtOH
 - Numune Safılaştırma Boncukları, Uç Onarım Karışımı ve NIPT DNA Adaptörü Plakası
3. Onay kutularını seçin ve ardından **OK** (Tamam) ögesini seçin.
4. Library Prep Box barkodlarını tarayın.
5. Kullanıcı adını veya reaktifi hazırlayan kişinin baş harflerini girin ve ardından **OK** (Tamam) ögesini seçin.
6. Accessory Box barkodlarını tarayın.
7. Kullanıcı adını veya reaktifi hazırlayan kişinin baş harflerini girin ve ardından **OK** (Tamam) ögesini seçin.

8. Uçları aşağıdaki gibi uç taşıyıcısına yükleyin ve ardından her bir taşıyıcı için **OK** (Tamam) ögesini seçin.

Numune Serisi Boyutu	Taşıyıcı Türü	İzleme	Kalem	Bölge Konumu
24	Uç	1-6	50 µl uçlar	1
		7-12	300 µl uçlar	1, 2
48	Uç	1-6	50 µl uçlar	1, 2
		7-12	300 µl uçlar	1, 2, 3, 4
96	Uç	1-6	50 µl uçlar	1, 2, 3, 4
		7-12	300 µl uçlar	1, 2, 3, 4, 5

9. cfDNA Ekstraksiyonu prosedüründen sonra protokolü durdurduysanız sayılan uçları aşağıdaki gibi uç taşıyıcısına yükleyin.

Numune Serisi Boyutu	Taşıyıcı Türü	İzleme	Kalem	Bölge Konumu
24, 48, 96	Uç	49-54	1000 µl uçlar	1
			300 µl uçlar	2
			50 µl uçlar	3

10. Her bir uç rafı için ilk ucun konumunu girin ve ardından **OK** (Tamam) ögesini seçin.

11. Barkodların yapıştırılmış olduğunu teyit edin ve plakaları aşağıdaki gibi plaka taşıyıcısına yükleyip (barkodlar sağa dönük olarak) **OK** (Tamam) ögesini seçin.

Numune Serisi Boyutu	Taşıyıcı Türü	İzleme	Kalem	Bölge Konumu
24, 48, 96	Multiflex	19-24	cfDNA Elüsyon plakası - barkodlu	1
			NIPT DNA Adaptörü plakası - barkodlu	2
			Yeni 96 kuyulu tam etekli plaka, kütüphaneler - barkodlu	3
			Yeni 96 kuyulu tam etekli plakalar	4, 5

12. Derin kuyulu taşıyıcıyı aşağıdaki gibi yükleyin ve ardından **OK** (Tamam) ögesini seçin.

Numune Serisi Boyutu	Taşıyıcı Türü	İzleme	Kalem	Bölge Konumu
24, 48, 96	Derin kuyulu	39–44	Derin kuyulu haznede 50 ml %80 EtOH	1
			Yeni 96 kuyulu tam etekli plakalar	2, 3, 4, 5

13. Reaktif tüplerini aşağıdaki gibi reaktif taşıyıcısına yükleyin ve ardından **OK** (Tamam) ögesini seçin.

Numune Serisi Boyutu	Taşıyıcı Türü	İzleme	Kalem	Bölge Konumu
24, 48, 96	Reaktif	47	2,5 ml Uç Onarım Karışımı	1
			Hazırlanan A-Kuyruklama Karışımı (toplam hacim)	2
			Hazırlanan Bağlama Karışımı (toplam hacim)	3
			10 ml Numune Saflaştırma Boncukları	4
			12 ml Hibridizasyon Tamponu	5

14. 12 ml Hibridizasyon Tamponunun (HT1) kalanını havuzlama için kapta saklayın.

15. Taşıyıcıların, laboratuvar donanımının ve reaktiflerin belirtilen biçimde yüklendiğinden emin olun ve ardından Library Deck Verification (Kütüphane Tablası Doğrulama) ekranından **OK** (Tamam) ögesini seçin.

16. Otomatik reaktif hacmi kontrolünün tamamlanmasını bekleyin.

17. Otomatik adımlar sırasında ML STAR'ı gözlemleyin.

18. Workflow Manager tarafından istem verildiğinde ML STAR yükleme tablasında ML STAR'ın taşıyıcıları boşaltması için hiçbir engel bulunmadığından emin olun.

19. Tablayı boşaltmak için **Unload** (Boşalt) ögesini seçin.

20. Her bir kuyuda yeterli hacimler olup olmadığı açısından Kütüphaneler plakasını inceleyin.



DİKKAT

Kuyu hacimleri tutarsızsa numuneler, otomatik kalite kontrolden geçemeyebilir.

21. Depolayacaksanız Kütüphaneler plakasını kapatıp muhafaza edin.

22. Taşıyıcıları boşaltın ve tablayı temizleyerek **OK** (Tamam) ögesini seçin.

23. Etkilenen kuyular hakkındaki yorumları girin ve ardından **OK** (Tamam) ögesini seçin.

24. Aşağıdaki adımlardan birini gerçekleştirin:

- Kütüphane Miktar Tayini prosedürüne devam etmek için **Yes** (Evet) ögesini seçin.
- Durdurmak için **Exit** (Çıkış) ögesini seçin.

GÜVENLİ DURMA NOKTASI

Çalışmayı durduruyorsanız Kütüphaneler plakasını depolamadan önce kapatın. Kütüphaneler plakası hazırlanma tarihinden sonra en fazla 7 gün -25 °C ila -15 °C'de stabildir.

Kütüphane Miktar Tayini**Hazırlık**

1. Aşağıdaki reaktifleri hazırlayın:

Reaktif	Depolama	Talimatlar
DNA Quantification Reagent (DNA Miktar Tayini Reaktifi)	2 °C ila 8 °C	Işıktan koruyun. 30 ila 150 dakika süreyle oda sıcaklığında buzunu çözünüz. (Kütüphaneleri Hazırlama prosedürünün başlangıcında reaktifin çıkarılması önerilir.) Karıştırmak için vorteksleyin ve ardından kısa süre santrifüjleyin.
DNA Quantification Standard (DNA Miktar Tayini Standardı)	2 °C ila 8 °C	Karıştırmak için vorteksleyin ve ardından kısa süre santrifüjleyin.
Resuspension Buffer (Yeniden Askıya Alma Tamponu)	2 °C ila 8 °C	Karıştırmak için vorteksleyin.

2. Kütüphaneler plakası dondurulmuş olarak depolanmışsa aşağıda belirtildiği şekilde hazırlayın.
 - a. Plakanın 7 günden uzun süredir depolanmadığını teyit edin ve oda sıcaklığında çözünüz.
 - b. Karıştırmak için vorteksleyin.
 - c. 1000 × g ile 1 dakika süreyle santrifüjleyin.
3. Kullanmadan 10 dakika önce florometreyi çalıştırın.
4. Yeni 384 kuyulu plakaya barkod yapıştırın.
5. Yeni tam etekli plakaya barkod yapıştırın.

Prosedür

1. Miktar tayinini başlatmak için **OK** (Tamam) ögesini seçin.
2. VeriSeq NIPT Method (VeriSeq NIPT Yöntemi) halihazırda açık değilse:
 - a. AppLauncher uygulamasını açın ve **VeriSeq NIPT Method** (VeriSeq NIPT Yöntemi) ögesini seçin.
 - b. Seri Numarasını ve kullanıcı adını girip **OK** (Tamam) ögesini seçin.
3. Accessory Box barkodlarını tarayın.

4. Kullanıcı adını veya reaktifi hazırlayan kişinin baş harflerini girin ve ardından **OK** (Tamam) ögesini seçin.
5. Uçları aşağıdaki gibi uç taşıyıcıya yükleyin ve ardından **OK** (Tamam) ögesini seçin.

Numune Serisi Boyutu	Taşıyıcı Türü	İzleme	Kalem	Bölge Konumu
24, 48	Uç	1-6	300 µl uç rafı	1
			50 µl uç rafı	2
96	Uç	1-6	300 µl uç rafı	1
			50 µl uç rafı	2, 3

6. Barkodların yapıştırıldığını teyit edin.
7. Gerekliyse Kütüphaneler plakasını açın.
8. Plakaları aşağıdaki gibi (barkod sağa dönük olarak) Multiflex taşıyıcısına yükleyin ve ardından **OK** (Tamam) ögesini seçin.

Numune Serisi Boyutu	Taşıyıcı Türü	İzleme	Kalem	Bölge Konumu
24, 48, 96	Multiflex	19-24	Yeni tam etekli plakalar - barkodlu	1
			Yeni 384 kuyulu plaka - barkodlu	2
			Kütüphaneler plakası - barkodlu	3
			Yeni 96 kuyulu tam etekli plakalar	4, 5

9. Başlıksız reaktif tüplerini aşağıdaki gibi tüp taşıyıcısına yükleyin ve ardından **OK** (Tamam) ögesini seçin.

Numune Serisi Boyutu	Taşıyıcı Türü	İzleme	Kalem	Bölge Konumu
24, 48, 96	Tüp	46	DNA Quantification Standard (DNA Miktar Tayini Standardı)	1
			DNA Quantification Reagent (DNA Miktar Tayini Reaktifi)	2

10. Reaktif tüplerini aşağıdaki gibi reaktif taşıyıcısına yükleyin ve ardından **OK** (Tamam) ögesini seçin.

Numune Serisi Boyutu	Taşıyıcı Türü	İzleme	Kalem	Bölge Konumu
24, 48, 96	Reaktif	47	Yeni reaktif tüpü (boş)	1
			16 ml Yeniden Askıya Alma Tamponu	2

11. Kütüphane Hazırlama prosedüründen sonra protokolü durdurduysanız sayılan uçları aşağıdaki gibi uç taşıyıcısına yükleyin.

Numune Serisi Boyutu	Taşıyıcı Türü	İzleme	Kalem	Bölge Konumu
24, 48, 96	Uç	49–54	1000 µl uçlar	1
			300 µl uçlar	2
			50 µl uçlar	3

12. Her bir uç rafı için ilk ve son ucun konumunu girin ve ardından **OK** (Tamam) ögesini seçin.
13. Taşıyıcıların, laboratuvar donanımının ve reaktiflerin belirtilen biçimde yüklendiğinden emin olun ve ardından Quant Deck Verification (Miktar Tayini Tablası Doğrulama) ekranından **OK** (Tamam) ögesini seçin.
14. Otomatik reaktif hacmi kontrolünün tamamlanmasını bekleyin.
15. Otomatik adımlar sırasında ML STAR'ı gözlemleyin.
16. Workflow Manager tarafından istem verildiğinde ML STAR yükleme tablasında ML STAR'ın taşıyıcıları boşaltması için hiçbir engel bulunmadığından emin olun.
17. Tablayı boşaltmak için **Unload** (Boşalt) ögesini seçin.
18. Kütüphaneler plakasını boşaltın.
- Her bir kuyuda yeterli hacimler olup olmadığı açısından plakayı inceleyin.
 - Kütüphaneler plakasını kapatın ve florometrik veri analizi tamamlanana kadar oda sıcaklığında saklayın.
19. Kalan 96 kuyulu plakaları boşaltın ve her bir kuyuda tutarlı hacimler olduğunu inceleyin. Hacimdeki büyük hatalar pipetleme adımlarıyla ilgili bir sorunu belirtebilir.
20. 384 kuyulu plakayı boşaltın ve uygun kuyulardaki sıvıları kontrol edin.
21. Plakayı folyoyla kapatın.
22. 1000 x g ile 20 saniye boyunca santrifüjleyin.
23. Oda sıcaklığında, ışıktan korunmuş olarak 10 dakika boyunca inkübe edin.
24. Tüm taşıyıcıları boşaltın.
25. ML STAR tablasını temizleyip **OK** (Tamam) ögesini seçin.



DİKKAT

Veri elde edilene dek miktar tayini reaktiflerini atmayın. Yeniden miktar tayini yapmanız gerekirse reaktiflere ihtiyacınız olacaktır.

26. İnkübasyonun ardından folyo kapağı açın ve 384 kuyulu plakayı mikroparka okuyucuya yükleyin. Molecular Devices tarafından sağlanan mor adaptör plakasını (Parça Numarası: 0310-4336) veya eşdeğerini (kullanılan alet için uygunsuz) kullandığınızdan emin olun.
- Yükleme sırasında A1'in sol üst köşede olduğundan emin olun.
27. SoftMax Pro'da açmak için VeriSeq NIPT şablonuna çift tıklayın.
28. Home (Ana Sayfa) sekmesinde **New Experiment** (Yeni Deney) ögesini seçin.

29. **Read** (Okuma) ögesini seçin.
30. Verileri XML olarak aşağıdaki gibi dışa aktarın.
 - a. **Plate** (Plaka) seçeneğine sağ tıklayın ve ardından **Rename** (Yeniden Adlandır) ögesini seçin.
 - b. Miktar Tayini plakasının barkodunu tarayın ve ardından **OK** (Tamam) ögesini seçin.
 - c. Ekranın sol üst köşesindeki plaka simgesini seçin ve ardından menüden **Export** (Dışa Aktar) ögesini seçin.
 - d. **Expt name** (Dışa Aktarma Adı) onay kutusunu seçin, plaka tarihi seçeneğini işlenmemiş olarak ayarlayın, çıktı formatını XML olarak ayarlayın ve **OK** (Tamam) ögesini seçin.
 - e. Çıktı dosyası yolunu ve adını belirleyin ve ardından **Save** (Kaydet) ögesini seçin.
Hamilton bilgisayar dosya konumuna erişebilmelidir. Dosya adında veya dosya yolunda boşluk kullanmayın.

Analiz

1. ML STAR'da Scanner Information (Tarayıcı Bilgisi) ekranından florometre numarasını girin.
2. Florometre çalıştırması ile ilgili yorumları girin ve ardından **OK** (Tamam) ögesini seçin.
3. Florometrik verileri içeren *.xml miktar tayini dosyasına gidin ve ardından **OK** (Tamam) ögesini seçin.
4. Standartlar eğrisi ve numune konsantrasyonu analiz sonuçlarını inceleyin ve ardından **OK** (Tamam) ögesini seçin.
5. Plakayı yeniden taramanız gerekiyorsa **Rescan** (Yeniden Tara) ögesini seçin.
Numuneler zamana ve ışığa karşı duyarlıdır. Gerektiğinde hemen yeniden tarama gerçekleştirin.
6. Etkilenen kuyular hakkındaki yorumları girin ve ardından **OK** (Tamam) ögesini seçin.
7. Sonuçları değerlendirin ve aşağıdaki gibi devam edin.
 - Sonuçlar spesifikasyonu geçerse [Kütüphaneleri Havuzlama, sayfa 37](#) kısmına geçin. Spesifikasyonlar için *VeriSeq NIPT Solution v2 Software Kılavuzu (belge no 1000000067940)* belgesindeki miktar tayini KK metrikleri ve sınırlar tablosuna bakın.
 - Sonuçlar spesifikasyonu karşılamazsa sistem yöntemi iptal eder. [Hazırlık, sayfa 33](#) ile başlayarak miktar tayini prosedürlerini tekrarlayın.
8. Aşağıdaki adımlardan birini gerçekleştirin:
 - [Kütüphaneleri Havuzlama, sayfa 37](#) işlemine geçmek için **Yes** (Evet) ögesini seçin.
 - Durdurmak için **Exit** (Çıkış) ögesini seçin.

GÜVENLİ DURMA NOKTASI

Çalışmayı durduruyorsanız Kütüphaneler plakasını depolamadan önce kapatın. Kütüphaneler plakası -25 °C ila -15 °C'de toplamda en fazla 7 gün depolandığında stabildir.

Kütüphaneleri Havuzlama

Hazırlık

1. Aşağıdaki reaktifleri hazırlayın:

Reaktif	Depolama	Talimatlar
Hybridization Buffer (Hibridizasyon Tamponu)	-25 °C ila -15 °C	Oda sıcaklığında çözünüz. Karıştırmak için vorteksleyin. Kullandıktan sonra tekrar depolayın.

2. Kütüphaneler plakası dondurulmuş olarak depolanmışsa aşağıda belirtildiği şekilde hazırlayın.
 - a. Plakanın 7 günden uzun süredir depolanmadığını teyit edin ve oda sıcaklığında çözünüz.
 - b. 1 dakika boyunca 1500 rpm'de vorteksleyin.
 - c. 1000 x g ile 20 saniye boyunca santrifüjleyin.
 - d. Karıştırmak için pipetleyin.
3. Boş bir havuzlama tüpünü Havuz A olarak etiketleyin. 96 numune için, ikinci bir boş havuzlama tüpünü Havuz B olarak etiketleyin.
4. Aşağıdaki denşirme programını ısıtmalı kapağı olan termal döngüleyiciye kaydedin.
 - a. Önceden ısıtılmış kapak seçeneğini seçin ve 102 °C'ye ayarlayın.
 - b. Reaksiyon hacmini 50 µl olarak ayarlayın.
 - c. Artış oranını maksimuma (saniyede ≥ 2 °C) ayarlayın.
 - d. 96 °C'de 10 dakika boyunca ve sonra 4 °C'de 5 saniye boyunca inkübe edin.
 - e. 4 °C'de tutun.

Prosedür

1. Kütüphaneler plakasını önceden programlanmış termal döngüleyiciye yerleştirin ve denşirme programını çalıştırın.
Yeniden miktar tayini yapmak isteyebileceğiniz için miktar tayini KK metriklerinde başarılı olmadan Kütüphaneler plakasını denşirmeyin.
2. Kütüphaneler plakasını 20 saniye süreyle 1000 x g ile santrifüjleyin.
3. Kütüphaneleri havuzlamaya başlamak için **OK** (Tamam) ögesine tıklayın.
4. VeriSeq NIPT Method (VeriSeq NIPT Yöntemi) açık değilse:
 - a. AppLauncher uygulamasını açın ve **VeriSeq NIPT Method** (VeriSeq NIPT Yöntemi) ögesini seçin.
 - b. Seri Numarasını ve kullanıcı adını girip **OK** (Tamam) ögesini seçin.
5. Havuz konsantrasyonunu seçin ve ardından **OK** (Tamam) ögesini seçin.
Hedef küme yoğunluğu 220–260 K/mm²'dir.

NOT 48/96 numunelik serilerle elde edilenlere benzer küme yoğunluklarını korumak üzere 24 numunelik seriler için havuzlama konsantrasyonlarının ve/veya havuzlama hacimlerinin artırılması gerekebilir.

6. Workflow Manager tarafından istem verilmesi durumunda aşağıdaki adımlardan birini gerçekleştirin:

- Bir numune sayfası yüklemek için seriyle ilişkili numune sayfasını seçin ve ardından **Load** (Yükle) ögesini seçin.
- Kalan numune türleri, cinsiyet raporlaması veya tarama türü için sistem varsayılan değerlerini kullanmak üzere her ayar için **Use Default** (Varsayılanı Kullan) ögesini seçin.
Numune sayfası oluşturma hakkında bilgi için bkz. *VeriSeq NIPT Solution v2 Software Kılavuzu (belge no 1000000067940)*.

7. Plaka denşirme zamanlamasını başlatmak için **Start** (Başlat) ögesini seçin.

8. Uçları aşağıdaki gibi uç taşıyıcılarına yükleyin.

Numune Serisi Boyutu	Taşıyıcı Türü	İzleme	Kalem	Bölge Konumu
24, 48, 96	Uç	7–12	50 µl filtreli uçlar	1

9. Denşirilen Kütüphane plakasını aşağıdaki gibi (barkod sağa dönük olarak) Multiflex taşıyıcısına yükleyin ve ardından **OK** (Tamam) ögesini seçin.

Numune Serisi Boyutu	Taşıyıcı Türü	İzleme	Kalem	Bölge Konumu
24, 48, 96	Multiflex	19–24	Denşirilen Kütüphane plakası (barkodlu)	1

10. Havuzlama tüplerini aşağıdaki gibi tüp taşıyıcısına yükleyin ve ardından **OK** (Tamam) ögesini seçin.

Numune Serisi Boyutu	Taşıyıcı Türü	İzleme	Kalem	Bölge Konumu
24, 48	Tüp	46	Yeni 2 ml tüp, Havuz A	1
96	Tüp	46	Yeni 2 ml tüp, Havuz A	1
			Yeni 2 ml tüp, Havuz B	2

11. Reaktif tüplerini aşağıdaki gibi reaktif taşıyıcısına yükleyin ve ardından **OK** (Tamam) ögesini seçin.

Numune Serisi Boyutu	Taşıyıcı Türü	İzleme	Kalem	Bölge Konumu
24, 48, 96	Reaktif	47	3 ml Hibridizasyon Tamponu	1

12. Uçları aşağıdaki gibi uç taşıyıcısına yükleyin.

Numune Serisi Boyutu	Taşıyıcı Türü	İzleme	Kalem	Bölge Konumu
24, 48, 96	Uç	49–54	1000 µl filtrelili uçlar	1
			300 µl filtrelili uçlar	2
			50 µl filtrelili uçlar	3

13. Her bir uç rafı için ilk ve son ucun konumunu girin ve ardından **OK** (Tamam) ögesini seçin.
14. Taşıyıcıların, laboratuvar donanımının ve reaktiflerin belirtildiği şekilde yüklendiğinden emin olun.
15. Pooling Deck Verification (Havuzlama Tablası Doğrulama) ekranında **OK** (Tamam) ögesini seçin.
16. Otomatik adımlar sırasında ML STAR'ı gözlemleyin.
17. Etkilenen kuyular hakkındaki yorumları girin ve ardından **OK** (Tamam) ögesini seçin.
18. Workflow Manager tarafından istem verildiğinde ML STAR yükleme tablasında ML STAR'ın taşıyıcıları boşaltması için hiçbir engel bulunmadığından emin olun.
19. Tablayı boşaltmak için **Unload** (Boşalt) ögesini seçin.
20. Tüp taşıyıcısını boşaltın.
21. Her bir havuzlama tüpünü kapatın, vorteksleyin ve ardından kısa süre santrifüjleyin.
22. **OK** (Tamam) ögesini seçin.
23. Havuzlamadan sonra kütüphaneleri en kısa sürede sekanslayın. Yeniden havuzlamaya olanak sağlamak için Kütüphaneler plakasını kapatın ve -25 °C ila -15 °C'de en fazla 7 gün süreyle depolayın.

GÜVENLİ DURMA NOKTASI

Çalışmayı durduruyorsanız havuzlama tüplerinin kapağını kapatın ve en fazla 7 gün -25 °C ila -15 °C'de depolayın.

Sekanslama için Havuzlanan Kütüphaneleri Hazırlama

Hazırlık

1. Aşağıdaki reaktifleri hazırlayın:

Reaktif	Depolama	Talimatlar
Havuz tüpleri	-25 °C ila -15 °C	Daha önce depolanmışsa oda sıcaklığında çözündürün. Kısa süre vorteksleyin. Kısa süre santrifüjleyin.

2. Local Run Manager VeriSeq NIPT Module modülünde aşağıdaki alanları doldurarak yeni nesil sekanslama sistemini hazırlayın:
 - a. Çalıştırma Adı
 - b. [İsteğe Bağlı] Çalıştırma Açıklaması

c. Havuz Barkodu

**DİKKAT**

Local Run Manager modülüne girilen Havuz Barkodu, Workflow Manager'a girilen Havuz Barkodu ile eşleşmelidir. Hatalı çalıştırma yapılandırmaları analiz yazılımı tarafından reddedilir ve yeniden sekanslama gerektirir.

Local Run Manager VeriSeq NIPT Module'ü kullanma konusunda daha fazla bilgi için bkz. *VeriSeq NIPT Solution v2 Software Kılavuzu (belge no 1000000067940)*.

Prosedür

1. Aşağıdaki sarf malzemelerini reaktif kartuşuna ekleyin ve ardından karıştırmak için pipetleyin.
 - Hibridizasyon Tamponu (900 µl)
 - 450 µl Havuz A (450 µl)
2. Yeni nesil sekanslama cihazınızın referans kılavuzundan yararlanarak sekanslamaya geçin. NextSeq 550Dx için bkz. *NextSeq 550Dx Instrument Referans Kılavuzu (belge no 1000000009513)* (veya www.support.illumina.com adresindeki Illumina Destek sayfasında belirtildiği şekilde ilgili kullanım talimatına bakın).
3. İstem verildiğinde doğru çalıştırma yapılandırmasını teyit edin.
4. Gerekirse bu prosedürü Havuz B için tekrar edin.
 - Hedef küme yoğunluğu aralığını elde etmek için kütüphane plakası Hamilton üzerinde farklı bir havuzlama konsantrasyonu kullanılarak yeniden havuzlanabilir. Yeniden havuzlama yapıldığında orijinal havuz geçersiz kılınır.
 - Alternatif olarak, hedef küme yoğunluğu aralığına ulaşmak için havuzun HT1'e oranı (450 µl + 900 µl) değiştirilebilir.

Yeni Nesil Sekanslama

VeriSeq NIPT Solution v2, aşağıdaki spesifikasyonlara sahip bir yeni nesil sekanslama sistemi ile birlikte kullanılabilir:

- 2x36 çift sonlu okuma özelliği
- VeriSeq NIPT Sample Prep Kit'teki dizin adaptörlerine uyumlu
- İki kanallı kimya
- Otomatik BCL (*.bcl) dosyası üretimi (sekanslama cihazından ham veriler).
- Her çalıştırmada 400 milyon çift sonlu okuma
- VeriSeq NIPT Assay Software v2 ile uyumlu

NextSeq 550Dx cihazı VeriSeq NIPT Solution v2 ile uyumludur

Sekans Verileri Analizi

Sekanslama işlemi tamamlandıktan sonra sekanslama verileri analiz ve rapor oluşturma için otomatik olarak VeriSeq NIPT Assay Software v2'ye gönderilir. Rapor, serideki her bir numune için sınıflandırmalar ve tüm çalıştırma KK metriklerinin bir değerlendirmesini içerir. Sekanslamanın tamamlanmasından nihai sonuçlara kadar olan analiz süreci, 48 numunelik bir seri için yaklaşık 4 saat sürer. Veri analizi ve çıktı dosyası hakkında ayrıntılı bilgi için bkz. *VeriSeq NIPT Solution v2 Software Kılavuzu (belge no 1000000067940)*.

Sonuçların Yorumlanması

VeriSeq NIPT Solution v2 algoritması, sekanslanan çift sonlu kütüphane fragmanlarının birleşiminden elde edilen çeşitli bilgi türlerini bir araya getiren karmaşık bir istatistik modeli kullanır. Bu model, her bir numune kütüphanesinde olması gerekenden az ya da fazla temsil edilen genom bölgelerini saptamak üzere kullanılır. Önemli bir biçimde bu model, az ya da fazla temsil derecesinin kütüphane için tahmin edilen fetal fraksiyon düzeyinde fetal genomdaki anöploidi olayı ile kantitatif olarak uyumlu olup olmadığını dikkate alır.

Tüm kromozomlar için, çift sonlu sekanslama verileri referans genom (HG19) ile hizalanır. Benzersiz, tekrarlamayan, hizalanmış okumalar 100 kb'lık kutularda toplanır. Karşılık gelen kutu sayıları GC biası için ve daha önce belirlenen bölgeye özel gen kapsamına göre ayarlanır. Bunun gibi normalleştirilmiş kutu sayılarının kullanılmasıyla, anöploididen etkilenmiş olabilecek kapsam bölgeleri otozomların geri kalanıyla karşılaştırılarak her bir otozoma ilişkin istatistiksel skorlar türetilir. Her bir numune için logaritmik olabirlik oranı (LLR), bu kapsam bazlı skorlar ve tahmini fetal fraksiyonlar dikkate alınarak hesaplanır. LLR, gözlemlenen kapsam ve fetal fraksiyon göz önünde bulundurularak bir numunenin etkilenmiş olma olasılığına karşı gözlemlenen aynı kapsam göz önünde bulundurularak bir numunenin etkilenmemiş olma olasılığıdır. Bu oranın hesaplanmasında fetal fraksiyondaki tahmini belirsizlik de dikkate alınır. Sonraki hesaplamalar için oranın doğal logaritması kullanılır. Assay Software, anöploidinin tespit edilmesi için her bir hedef kromozoma ve her bir numuneye ilişkin LLR'yi değerlendirir.

Seri oluşturma sırasında bir numunenin türünü (tekil veya ikiz), tarama türünü (temel veya genom geneli) ve her numune için istenen cinsiyet kromozomu raporlamasını (Evet, Hayır ve SCA) tanımlamanız gerekir. Bu seçenekler bir araya geldiğinde her bir numune için raporlanan bilgiler belirlenir.

Tüm numune türleri için tarama türü hangi otozomal anomalilerin raporlandığını belirler. Temel tarama türü için yalnızca 13, 18 ve 21. kromozomları içeren tam kromozom trizomi olayları raporlanır. Genom geneli tarama türü için herhangi bir otozomal kromozoma ilişkin tüm veya parsiyel kromozom delesyonu ya da duplikasyonu raporlanır. Raporlanabilir en küçük parsiyel kromozom delesyon veya duplikasyon uzunluğu 7 Mb'dir.

Tekil numuneler için cinsiyet kromozomu raporlamasını devre dışı bırakabilirsiniz. Ayrıca cinsiyet kromozomu anöploidilerini raporlamayı, öploid numunelerinin cinsiyeti raporlaması ile veya olmadan gerçekleştirmek üzere yapılandırabilirsiniz.

İkiz numuneler söz konusu olduğunda, cinsiyet kromozomu raporlaması için Yes (Evet) seçeneği belirlenirse sonuç, kütüphanede bir Y kromozomunun varlığını ya da yokluğunu raporlama ile sınırlandırılır. İkiz numuneler için cinsiyet kromozomu anöploidisi raporlanamaz.

NOT Bir serideki tüm numuneler için raporlanan cinsiyet aynı olduğunda kullanıcıya, numune katkı maddesi/kontaminasyonu uyarısı içeren bir e-posta/WebUI bildirimi verilir. Seri geçersiz kılınır ve rapor oluşturulmaz. (VeriSeq NIPT Solution v2 server software v2.2 ve üzeri versiyonlar için geçerlidir.)

ANOMALY DETECTED (ANOMALİ SAPTANDI) sonucu, numune taramanın seçili tarama türü ve cinsiyet kromozomu raporlama seçeneği ile uyumlu bir veya daha fazla anomali için pozitif olduğunu belirtir. Anomali saptandığında rapor, sitogenetik açıklamada anomalinin açıklamasını sunar.

VeriSeq NIPT Assay Software v2, her bir numune için fetal fraksiyon tahmini (FFE) sağlamak üzere sekanslama sırasında oluşturulan istatistikleri kullanır. FFE, test tarafından değerlendirilen ve her numune için yuvarlanmış yüzde olarak rapor edilen tahmini fetal cfDNA bileşenidir. Bu tahminin tüm numuneler genelindeki ortalama standart sapması %1,3'tür. FFE, sonuçlar raporlanırken numunelerin hariç tutulması için tek başına kullanılamaz.

VeriSeq NIPT Assay Software v2, kromozom temsil aramaları yapmak üzere her numune için fetal fraksiyon tahmini göz önünde bulundurularak sistemin yeterli sekanslama kapsamı oluşturup oluşturmadığını belirten dinamik bir eşik ölçümü olan kişiselleştirilmiş Fetal Anöploidi Güven Testi (iFACT) kullanır. Negatif aramalar yalnızca numunenin iFACT eşiğini karşılaması durumunda raporlanır. Numune bu eşığe ulaşamazsa KK değerlendirmesi FAILED iFACT (BAŞARISIZ iFACT) mesajı görüntüler ve sistem bir sonuç oluşturmaz.

VeriSeq NIPT Assay Software v2, iFACT'e ek olarak, analiz sırasında birtakım farklı KK metriklerini daha değerlendirir. Ek metrikler, referans genom bölgelerinde kapsam tekdüzeliğine ilişkin değerlendirmeleri ve cfDNA fragman uzunluklarının dağıtımlarını içerir. KK değerlendirmesi, kabul edilebilir aralık dışındaki tüm metrikler için KK işareti veya KK hatası görüntüler. KK hatası durumunda, sistem numune için bir sonuç oluşturmaz. Numune KK için başarısız olursa kan toplama tüpünde yeterli plazma hacminin bulunması koşuluyla numune yeniden işlenebilir.

VeriSeq NIPT Solution v2 nihai raporda kullanıma yönelik veriler oluşturur. Hasta için nihai bir rapor oluşturmaz. Müşteriler, bakım noktasındaki hekime iletilecek nihai raporun tasarımını ve içeriğini belirlemekten sorumludur. Illumina, müşterilerin nihai raporundaki ifadelerin doğruluğundan sorumlu değildir.

DİKKAT

Tüm numunelerin fetal fraksiyon tahminlerini kontrol edin. Fetal fraksiyon tahminleri bir çalıştırmadaki tüm numuneler için benzerse numune karışması durumu meydana gelmiş ve sonuçları etkilemiş olabilir. Sorun giderme yardımı almak için Illumina Teknik Destek birimi ile iletişime geçin.

Performans Özellikleri

Klinik performans ve analitik performans bölümlerinde özetlenen aşağıdaki veriler, plazma ile başlayarak Kullanım Talimatları bölümünde ana hatlarıyla verilen protokoller ve materyaller kullanılarak oluşturulmuştur. Bu bölüme ilişkin tüm sekanslama verileri aşağıdaki yapılandırmalar ile NextSeq 500/550 Sequencing System veya NextSeq 550Dx Sequencing System üzerinde oluşturulmuştur:

	NextSeq 500/550	NextSeq 550Dx
Cihaz Üzerindeki Yazılım	NextSeq Control Software 4.0	NextSeq Operating Software 1.3
Reaktif Kiti Versiyonu	NextSeq 500/550 High Output v2.5 (75 cycle) Reagent Kit	NextSeq 550Dx High Output v2.5 (75 cycle) Reagent Kit
Sekanslama Yöntemi	Yüksek çıktı modunda 2x36 çift sonlu sekanslama çalıştırması	Yüksek çıktı modunda 2x36 çift sonlu sekanslama çalıştırması

Klinik Çalışma

VeriSeq NIPT Solution v2'nin klinik doğruluğu, tekil ve ikiz gebeliği olan hamile kadınlardan elde edilen plazma numunelerinin değerlendirilmesi ile ortaya konmuştur. Numuneler, daha önce periferik tam kan numunelerinden işlenen kimliksizleştirilmiş depolanan plazma numunelerinden elde edilmiştir. 45.000'den fazla numunenin çalışmaya dahil edilmesi planlanmıştır. Bu numuneler, 7 Mb veya üzerindeki parsiyel delesyon ve duplikasyonlar ve fetal kromozom anöploidileri için daha önce prenatal taramaya tabi tutulmuştur. Etkilenen gebeliklerden elde edilen tüm numuneler ve etkilenmeyen gebeliklerden elde edilen ardışık numune alt kümesi, klinik sonuçların bulunması ve numune kriterlerinin karşılanması koşuluyla test için uygun görülmüştür. Test analiz setine toplam 2335 numune dahil edilmiştir. Bu sette, 2328 numune tekil gebeliklerden ve yedi numune ikiz gebeliklerden elde edilmiştir.

Bu numuneler arasından 28 numune (%1,2, 28/2335) tamamlanan sekanslama verilerinin analizi sırasında ilk geçişte test KK çalışmasında başarısız olmuştur:

- Başarısız 27 iFACT (bir XO, 26 etkilenmemiş)
- Beklenen aralığın dışındaki veriler için bir başarısızlık

Demografik Özellikler ve Gebelik Özellikleri

Bilinen mozaik numuneler dahil olmak üzere genom geneli taramada numuneler için maternal yaş, gebelik süresi ve gebelik trimestresi [Tablo 7'](#)de özetlenmektedir. Test numunelerinin çoğunluğu (%98) birinci trimestre gebeliği temsil etmektedir.

Demografik özellikler, temel ve genom geneli kohortlar arasında değerlendirilmiş ve hiçbir istatistiksel fark görülmemiştir. Demografik özellikler ve gebelik özellikleri, bilinen mozaiklerin dahil edilmesinden veya hariç tutulmasından bağımsız olarak benzer olmuştur.

Tablo 7 Demografik Özellikler ve Gebelik Özellikleri

Özet İstatistik	Genom Geneli (bilinen mozaikler dahil)
Numune sayısı	2307*
Maternal yaş – yıl	
Ortalama	35,08
Standart Sapma	4,04
Medyan	34,95
25. Persentil, 75. persentil	32,31, 37,79
Minimum, maksimum	20,22, 53,02
Kan alımı sırasındaki gebelik süresi - hafta	
Ortalama	10,93
Standart Sapma	1,20
Medyan	10,57
25. persentil, 75. persentil	10,29, 11,14
Minimum, maksimum	10,00, 27,86
Gebelik trimestresi - n (%)	
< Birinci (<14 hafta)	2252 (%98)
İkinci	54 (%2)
Üçüncü (≥ 27 hafta)	1 (%0)

* Sunulan nihai numuneler 7 ikiz içermiştir.

Klinik Performans

VeriSeq NIPT Solution v2 tarafından aranan sonuçlar, klinik referans standardı sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır. Tüm çalışma numuneleri, fetal kromozomal anöplöidi durumu ve 7 Mb veya üzeri parsiyel delesyonlar ve duplikasyonlar ile ilgili olarak klinik referans standardı sonuçları (klinik doğru) vermiştir. Bu çalışmaya dahil edilen numuneler için klinik referans standardı belirlenirken, kromozom analizi sonuçları veya NGS bazlı NIPT negatif taraması içeren bir yenidoğan fizik muayenesi sonuçları temel alınmıştır. Eğitimli çalışma personeli, destekleyicinin Tıbbi Kodlama belgesi doğrultusunda klinik referans standardı verilerini sınıflandırmıştır.

Kromozom analizi yöntemleri arasında karyotipleme, floresan in situ hibridizasyon (FISH) veya karşılaştırmalı genomik hibridizasyon kromozom mikroarrayi (CMA) yer almıştır. Kromozom analizi neonatal veya infant periferik kanı veya salyası, gebelik ürünleri (POC) numuneleri, amniyositler, koryon villus, plasenta dokuları ya da postnatal göbek kordonu kanı üzerinde gerçekleştirilmiştir.

Mosaisizm, bir bireyde iki veya daha fazla farklı kromozomal kompozisyon hücre hattının bulunması olarak tanımlanır. Hücre hatları aynı zigottan çıkar. Mosaisizm türü ve düzeyi farklılık gösterir ve embriyogenez ve fetal gelişim sırasında mozaik olayların zamanlamasına bağlıdır. Sitotrofoblast, mezenşim veya fetüs üzerinde anormal-normal hücre hatlarının dağıtımına bağlı olarak prenatal tanıda farklı mosaisizm türleri görünür.¹⁰ Mosaisizm her ne kadar her kromozomal anomali ile birlikte görülebilse de nadir trizomilerde mosaisizm prevalansı 21, 18 ve 13. kromozom (T21, T18 ve T13) trizomilerinden daha yüksektir.¹¹ Bu testin tarama türünün amacı nadir otozomal anöploidleri (RAA'lar) saptamak olduğundan, performans değerlendirmesi sırasında mozaik vakaları genom geneli analize dahil edilmiştir.

Temel Tarama Performansı

Temel tarama için anomaliler arasında T21, T18 ve T13 yer almaktadır. Analize toplam 2243 tekil ve ikiz numune dahil edilmiştir. Yedi ikiz gebeliğin tümü doğru şekilde T21 olarak saptanmış ve aşağıdaki tabloda raporlanmamıştır.

Tablo 8 Tekil Gebelikler İçin Temel Taramada (Bilinen Mozaikler Hariç) Trizomi 21, 18 ve 13'ü Saptamaya Yönelik VeriSeq NIPT Solution v2 Duyarlılığı ve Özgüllüğü

	T21	T18	T13
Duyarlılık	> %99,9 (130/130)	> %99,9 (41/41)	> %99,9 (26/26)
2 taraflı %95 GA	%97,1, %100	%91,4, %100	%87,1, %100
Özgüllük	%99,90 (1982/1984)	%99,90 (1995/1997)	%99,90 (2000/2002)
2 taraflı %95 GA	%99,63, %99,97	%99,64, %99,97	%99,64, %99,97

Tablo 8 ile gösterildiği şekilde, temel taramanın test performansı RAA'lardan, parsiyel otozomal delesyon veya duplikasyonlardan ya da bilinen mosaisizmden etkilenen 64 numunelik bir alt grup hariç tutularak hesaplanmıştır. Bu 64 numuneye sekiz adet T21 ve üç adet T18 mozaik dahil edilmiştir. Bu 11 numuneden beşi, VeriSeq NIPT Assay Software v2 ile saptandığı gibi anomaliden etkilenmiş olarak tanımlanmıştır.

Genom Geneli Tarama Performansı

Genom geneli tarama için her türlü anomaliye trizomiler, monozomiler ve 7 Mb veya üzeri parsiyel delesyonlar veya duplikasyonlar dahildir. Genom geneli tarama numuneleri, bilinen mosaisizimli 36 numuneden oluşmuştur. Toplam 2307 tekil ve ikiz numune test edilmiştir. Yedi ikiz gebeliğin tamamı doğru şekilde 21. kromozom anomalisine sahip olarak saptanmış ve aşağıdaki tablolarda raporlanmamıştır.

Her Türü Anomali için Genom Geneli Tarama Performansı

Tablo 9 Genom Geneli Taramada (Bilinen Mozaikler Dahil) Her Türü Anomaliyi Saptamaya Yönelik VeriSeq NIPT Solution v2 Duyarlılığı ve Özgüllüğü

	Duyarlılık	Özgüllük
Tahmin %'si (n/N)	%95,5 (318/333)	%99,34 (1954/1967)
2 taraflı %95 GA	%92,7, %97,3	%98,87, %99,61

Nadir Otozomal Anöplöidi için Genom Geneli Tarama Performansı

Tablo 10 Genom Geneli Taramada (Bilinen Mozaikler Dahil) Nadir Otozomal Anöplöidi (RAA) için VeriSeq NIPT Solution v2 Duyarlılığı ve Özgüllüğü

	Duyarlılık	Özgüllük
Tahmin %'si (n/N)	%96,4 (27/28)	%99,80 (2001/2005)
2 taraflı %95 GA	%82,3, %99,4	%99,49, %99,92

Parsiyel Delesyonlar ve Duplikasyonlar için Genom Geneli Tarama Performansı

Tablo 11 Genom Geneli Taramada (Bilinen Mozaikler Dahil) 7 Mb veya Üzeri Parsiyel Delesyonlar ve Duplikasyonlar için VeriSeq NIPT Solution v2 Duyarlılığı ve Özgüllüğü

	Duyarlılık	Özgüllük
Tahmin %'si (n/N)	%74,1 (20/27)	%99,80 (2000/2004)
2 taraflı %95 GA	%55,3, %86,8	%99,49, %99,92

Temel ve Genom Geneli Taramalar Arasındaki Performans Farkları

Yaygın trizomiler ve cinsiyet kromozomu anöplöidileri için puanlama yöntemi, temel ve genom geneli taramaların her ikisi için de aynıdır. Temel tarama algoritmayı yalnızca T21, T18 ve T13'e uygular. Ancak genom geneli tarama tüm trizomiler, RAA'lar ve parsiyel duplikasyonlar ve delesyonlar için değerlendirme yapılabilmesi adına bu yöntem temelinde daha kapsamlı hale getirilmiştir.

Açıklanan performans raporlaması için temel ve genom geneli taramalar arasında iki fark söz konusudur. Birinci fark, genom geneli taramada, hem yaygın trizomiler hem RAA'lar ve parsiyel delesyonlar ve duplikasyonlar için bilinen mosaisizimli numunelerin performans metriklerine dahil edilmesidir. İkinci fark ise, genom geneli taramanın tercihe bağlı olarak tam trizomi genelinde parsiyel duplikasyon ya da delesyon saptamasını raporlayabilmesidir. Parsiyel duplikasyon veya delesyona ek olarak tam trizominin varlığı, tamamlayıcı raporda sunulan LLR skoruna başvurularak görülebilir.

Genom Geneli Taramaya Mozaiklerin Dahil Edilmesi

Mosaisizm, bu teste ilişkin bir sınırlama olarak listelenmiştir. Mosaisizm mevcut olduğunda bir anomalinin fetal sinyali azalır ve bu nedenle testin genel özgüllüğünden taviz vermeden saptama yapılması daha güç olabilir. Ancak mosaisizm, genişletilen içerikle daha ilintili olduğundan mosaisizimli numuneler genom geneli taramaya dahil edilmiştir.

Temel taramadan hariç tutulup genom geneli taramaya dahil edilen 64 numuneden 36'sı, klinik referans standardına göre mosaisizimli olarak tanımlanmıştır. Bu 36 numuneden 23 arama klinik referans standardı ile eşleşmiştir.

Parsiyel Delesyon veya Duplikasyon ve Tam Kromozom Anöploidisi Saptama

VeriSeq NIPT Solution v2 hem temel tarama hem genom geneli taramaya ilişkin menü seçenekleri içerir. Temel taramada, ANOMALY DETECTED (ANOMALİ SAPTANDI) sonucu yalnızca 21, 18 veya 13. kromozomlarda tam anöploidi saptandığında ve tüm kalite kontrol metriklerinin karşılanması durumunda raporlanır. Genom geneli taramada, sistem en az 7 Mb'lık parsiyel delesyon ve duplikasyon olaylarını ve tüm otozomlar genelinde anöploidileri saptar.

Genom geneli tarama kullanılırken hem aynı kromozom dahilindeki bir CNV olayının hem de tam kromozom olayının LLR eşliğini aştığı durumlarda, parsiyel delesyon veya duplikasyonun boyutu olayın saptandığı kromozomun yaklaşık %75'ini veya daha azını kapsıyorsa, sistem tam kromozom araması yerine parsiyel delesyon veya duplikasyon olayına öncelik verir. Saptanan parsiyel delesyon ve duplikasyon bölgesi kromozom boyutunun %75'inden büyükse, aynı zamanda tam kromozom için LLR eşliğinin aşılması halinde olay tam trizomi veya tam kromozomun monozomisi olarak raporlanır. Bu nedenle kromozom boyutunun %75'inden az veya %75'ine eşit olan önemli ölçüde büyük delesyonlar ve duplikasyonlar, tam kromozom anöploidisinin göstergesi olabilir.

Tüm numunelerde tam kromozom sınıflandırması için LLR skoru tamamlayıcı raporda bulunabilir. LLR skoru, sonuç yorumlanmadan önce [Şekil 2](#)'de belirtilen eşik değeri açısından incelenmelidir. Örneğin eşik aşan kromozom düzeyi LLR skorlarının tam kromozom anöploidisi ile uyumlu bir yorumlama için daha fazla destek sağladığı bir CNV araması için örnek olarak [Tablo 12](#)'ye bakın.

Klinik çalışmada, kromozomun bağıl boyutunun %75'inden az olmakla birlikte önemli ölçüde büyük duplikasyonlar içeren iki adet tekil gebelik numunesi (biri 21. kromozomda ve biri 18. kromozomda) bulunmuştur (bkz. [Tablo 12](#)). Her iki olay söz konusu kromozom için tam trizomi yerine parsiyel duplikasyonlar olarak rapor edilmiştir. Bu olaylara ilişkin LLR skorları tam trizomi için etkilenen sonuç ile uyumlu eşik değerinin üzerinde olmuştur. Parsiyel duplikasyon veya tam trizomi araması için, pozitif NIPT aramasına ilişkin takip yönetimi, hastaya prenatal tanı ile doğrulama testi sunar.

Tablo 12 Genom Geneli Taramada Tanımlanan Büyük Duplikasyon Olaylarına İlişkin Örnekler

	Klinik Doğru	Genom Geneli Sistem Çıktısı	Anomali Boyutu (Mb)	Kromozom %'si	LLR Skorları
Numune 1	Trizomi 21 tekil	21. kromozomda parsiyel duplikasyon	22,50	48,9	19,43
Numune 2	Trizomi 18 tekil	18. kromozomda parsiyel duplikasyon	47,00	60,2	12,99

Anöploidi sonuçlarını raporlamak için kullanılan Kalite Kontrol metrikleri hakkında ek bilgi için bkz. *VeriSeq NIPT Solution v2 Software Kılavuzu (belge no 1000000067940)*.

Cinsiyet Kromozomları

VeriSeq NIPT Solution v2 cinsiyet kromozomu sonuçları, klinik referans standardı sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır ve karşılaştırma aşağıdaki tabloda özetlenmiştir. Yüzde uyumu, her bir klinik referans standardı sonucu dahilinde her cinsiyet için hesaplanmıştır. Yüzde uyumu, VeriSeq NIPT Solution v2 cinsiyet kromozomu aramasının klinik referans standart sınıflandırmasıyla eşleştiği numunelerin sayısının, aynı klinik referans standart sınıflandırmasına sahip toplam numune sayısına bölünmesiyle hesaplanmıştır.

Tablo 13 Fetal Cinsiyet Sınıflandırması için Yüzde Uyumu*

Fetal Cinsiyet Sınıflandırması		Yenidoğan Fizik Muayenesinden Elde Edilen Fenotip		Sitojenik Sonuçlar							
Saptandı	Karyotip	Kız	Erkek	XX	XY	XO	XXX	XXY	XYY	Diğer**	Eksik
Anomali Saptanmadı	XX	997	0	21	0	2	0	0	0	0	0
Anomali Saptanmadı	XY	0	966	0	15	0	0	0	0	0	1
Anomali Saptandı	XO	0	0	0	0	19	0	0	1	0	0
Anomali Saptandı	XXX	0	0	0	0	0	17	0	0	1	0
Anomali Saptandı	XXY	0	0	0	0	0	0	23	0	1	0
Anomali Saptandı	XYY	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0
Toplam		997	966	21	15	21	17	23	12	2	1

Fetal Cinsiyet Sınıflandırması		Yenidoğan Fizik Muayenesinden Elde Edilen Fenotip		Sitojenik Sonuçlar							
Saptandı	Karyotip	Kız	Erkek	XX	XY	XO	XXX	XXY	XYY	Diğer**	Eksik
Yüzde Uyum		100	100	100	100	90,5	100	100	91,7	Geçerli Değil	Geçerli Değil

* Beş ikiz gebelik doğru şekilde Y varlığı olarak sınıflandırılmıştır. İki gebelik doğru şekilde "Y yok" olarak sınıflandırılmıştır.

** Diğer sitogenetik sonuçlar XXXXX ve XXYY olmuştur.

VeriSeq NIPT Solution v2 için Pozitif Prediktif Değer ve Negatif Prediktif Değer

Testin pozitif prediktif değeri (PPV) ve negatif prediktif değeri (NPV) test duyarlılığına, özgüllüğüne ve test öncesinde fetüsün trizomiden etkilenmiş olma olasılığına (prevalans) göre testin alınacak klinik kararlarda bilgi zeminini oluşturma kapasitesi hakkında bilgi sağlar. PPV ve NPV prevalansa bağlı olduğundan ve bu anöploidilere ilişkin prevalans farklı gönüllü popülasyonları arasında farklılık gösterebileceğinden PPV ve NPV değerleri, klinik doğruluk çalışmasının temel tarama (bilinen mozaikler olmadan) adımıyla gözlemlenen duyarlılık ve özgüllük değerlerine göre olası prevalans değerleri aralığı için hesaplanmıştır. [Tablo 17](#) için genom geneli tarama (bilinen mozaikler dahil) temel alınmıştır.

Tablo 14 Temel Taramada (Bilinen Mozaikler Hariç) Trizomi 21 Prevalansı, PPV ve NPV

Prevalans (%)	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

Tablo 15 Temel Taramada (Bilinen Mozaikler Hariç) Trizomi 18 Prevalansı, PPV ve NPV

Prevalans (%)	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

Tablo 16 Temel Taramada (Bilinen Mozaikler Hariç) Trizomi 13 Prevalansı, PPV ve NPV

Prevalans (%)	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

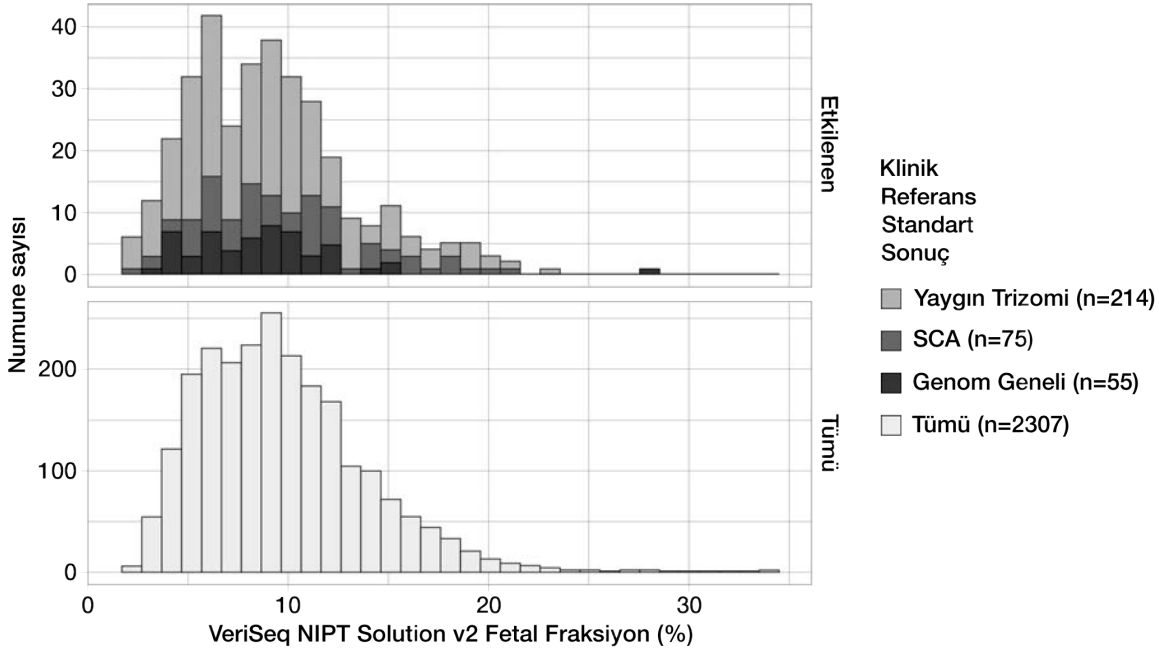
Tablo 17 Genom Geneli Taramada (Bilinen Mozaikler Dahil) Her Türlü Anomali Prevalansı, PPV ve NPV

Prevalans (%)	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

Fetal Fraksiyon Dağıtımı

Mozaiklerle genom geneli taramadan elde edilen VeriSeq NIPT Solution v2 Fetal Fraksiyon (FF) tahminlerinin dağılımı, Klinik Referans Standardı sonuç kategorisine göre [Şekil 1](#)'de gösterilmektedir.

Şekil 1 Fetal Fraksiyon Dağıtımı



5 numune, birden fazla kategoride anomali içermiştir.

Yaygın trizomi; trizomi 21, 18 ve/veya 13 içeren numunelerden oluşmaktadır.

Genom geneli, RAA veya parsiyel delesyon ve/veya duplikasyon içeren numunelerden oluşmaktadır.

FF tahminleri, %9 medyan ve %6–%12 çeyrekler arası açıklık (IQ) aralığı ile toplamda %2 ila %34 aralığında değişiklik göstermektedir. Genom geneli tarama tarafından saptanan olaylar ve yaygın trizomiler için medyan FF tahmini %8 ve SCA'lar için %9'dur. FF tahminlerinin aralığı tüm sonuçlar için tutarlı olmuştur. Genom geneli tarama tarafından saptanan yaygın trizomiler, SCA'lar ve olaylar arasında ya da genom geneli analizdeki tüm numunelerde FF dağıtımında bariz bir kayma yoktur.

İkiz Gebeliklerde Performans

İkiz Gebeliklerde Trizomi 13, 18 ve 21 ve Y Kromozomu Tahmini Performansı

İkiz gebeliklerde düşük trizomi 21, 18 ve 13 prevalansından dolayı klinik çalışma için yalnızca az sayıda etkilenen ikiz numune elde edilmiştir. İkiz gebeliklerde VeriSeq NIPT Solution v2'nin performansını tahmin etmek için ikiz gebelik popülasyonlarını simüle etmek üzere klinik numunelerden elde edilen gözlemlere dayalı *in silico* modeller kullanılmıştır. Bu simülasyon, amaçlanan kullanım popülasyonu ile uyumlu olmuştur. Fetal fraksiyon dağıtımı, yaklaşık 4500 ikiz numuneden tayin edilmiş ve yaklaşık 120.000 tekil numuneden elde edilen dağıtım ile karşılaştırılmıştır. Anöploidi durumuna koşullu olarak fetal fraksiyon dağıtımı, tekil olduğu varsayılan aramalardan tayin edilmiştir (1044 adet trizomi 21, 307 adet trizomi 18 ve 192 adet trizomi 13). İki dağıtımın kombinasyonu, ikizlerde anöploidi saptamasına ilişkin çıkarımlar yapılmasına olanak sağlamıştır. Dizigotik ve monozigotik ikiz setleri simüle edilmiştir ve duyarlılığı tahmin etmek üzere amaçlanan popülasyonda prevalanslarını temsil eden bir ağırlıklı ortalama (2 dizigotik: 1 monozigotik) alınmıştır. Özgüllük için etkilenmemiş ikiz setleri simüle edilmiştir.

Trizomiden etkilenen her bir simüle edilmiş numune fraksiyonu (yani etkilenmiş fraksiyon) her bir numune kategorisi için farklı şekilde hesaplanmıştır:

- Monozigotik ikizler için, her bir numunedeki etkilenmiş fraksiyon 1,0 olarak ayarlanmıştır. Bunun nedeni, trizominin bu durumda her iki ikizi de etkilemesidir.
- Dizigotik ikizler için, ikizlerden yalnızca birinin etkilendiği varsayılmıştır (her iki dizigotik ikizin etkilenmesi çok nadir görülür). Etkilenmiş fraksiyon değerleri, cinsiyetle uyumsuz klinik ikiz numunelerinden tayin edilen fetal fraksiyon oranlarının bilinen dağıtımı kullanılarak simüle edilmiştir. Etkilenmiş ikizin her zaman ikizlerden en düşük fetal fraksiyona sahip olduğu varsayımıyla konservatif bir yaklaşım benimsenmiştir. Trizomi 13 ve 18'in görüldüğü gebeliklerde ortalama olarak daha alt düzeyde olan fetal fraksiyonlar için düzeltme faktörü uygulanmıştır.
- Etkilenmemiş ikizler için, her bir numunenin etkilenmiş fraksiyonu sıfır olarak ayarlanmıştır.

Trizomi 18 veya 13'ten etkilenen ikizler için numunenin etkilenmiş fraksiyonuna karşılık gelen fetal fraksiyon azaltılmıştır. Azalma, trizomi 18 veya 13 tekillere karşı öploid tekillerdeki klinik verilerde gözlemlenen fetal fraksiyondaki ortalama azalma ile orantılı olmuştur.

Ardından, simüle edilen her numunenin hem etkilenmiş fraksiyonu hem genel fetal fraksiyonu standart VeriSeq NIPT Solution v2 algoritması ile bir anöploidi skoru hesaplamak üzere kullanılmıştır. Duyarlılık, simüle edilen etkilenmiş ikizlerin anöploidi skorlarının, karşılık gelen anöploidi eşiğinin ne sıklıkla üzerinde olduğu belirlenerek hesaplanmıştır. Buna uygun şekilde özgüllük ise, simüle edilen etkilenmemiş ikizler için anöploidi skorlarının, karşılık gelen anöploidi eşiğinin ne sıklıkla altında olduğu belirlenerek hesaplanmıştır (Tablo 18). %95 güven aralıkları; orijinal veri setindeki, ilgili trizomiye göre etkilenmiş veya etkilenmemiş olarak sınıflandırılan gerçek klinik ikiz numunelerinin sayısına göre tahmin edilmiştir.

İkiz numunelerdeki Y kromozomu duyarlılığını tahmin etmek için XY/XY ve XX/XY ikiz setleri simüle edilmiştir. Amaçlanan kullanım popülasyonundaki prevalanslarını temsil eden bir ağırlıklı ortalama alınmıştır (1 XY/XY: 1 XX/XY). İkizlerde Y kromozomu özgüllüğünü tahmin etmek için XX/XX ikiz seti simüle edilmiştir. Genel fetal fraksiyon değerleri, klinik ikiz numunelerindeki bilinen fetal fraksiyon dağıtımına göre simüle edilmiştir.

XY/XY ve XX/XY ikizleri için karşılık gelen Y kromozomu skorları, erkek olarak sınıflandırılan klinik tekil numunelerindeki Y kromozomu skorları ile fetal fraksiyon arasındaki bilinen ilişki kullanılarak tahmin edilmiştir. Yalnızca XX/XY ikizleri için etkilenmiş (yani erkek) fetal fraksiyon değerleri, cinsiyetle uyumsuz klinik ikiz numunelerinden tayin edildiği şekilde, aynı gebelikteki ikizler arasında gözlemlenen fetal fraksiyon oranlarının bilinen dağıtımı kullanılarak simüle edilmiştir. Etkilenmiş fraksiyonun ikizlerden küçük olanına karşılık geldiği konservatif bir yaklaşım benimsenmiştir. Her simüle edilen XX/XY numunesi için Y kromozomu skoru etkilenmiş fraksiyon ile çarpılmıştır.

XX/XX ikizleri için Y kromozomu skorları, kız olarak sınıflandırılan klinik tekil numunelerde gözlemlenen skordardan örneklenmiştir. Ardından Y kromozomu skoru ve genel fetal fraksiyon, simüle edilen her bir numuneyi standart VeriSeq NIPT Solution v2 algoritması ile "Y kromozomu mevcut" veya "Y kromozomu yok" olarak sınıflandırmak üzere kullanılmıştır.

Duyarlılık, simüle edilen XY/XY veya XX/XY ikizlerinin ne sıklıkla doğru şekilde “Y kromozomu mevcut” olarak sınıflandırıldığı belirlenerek hesaplanmıştır. Özgüllük, simüle edilen XX/XX ikizlerinin ne sıklıkla doğru şekilde “Y kromozomu yok” olarak sınıflandırıldığı belirlenerek hesaplanmıştır. %95 güven aralıkları, “Y kromozomu mevcut” ya da “Y kromozomu yok” olarak sınıflandırılan orijinal veri setindeki gerçek klinik ikiz numunelerinin sayısına göre tahmin edilmiştir.

Tablo 18 Simüle Edilen İkiz Gebelik Popülasyonunda Trizomi 21, 18 ve 13 Tahminleri

	Trizomi 21	Trizomi 18	Trizomi 13	Y Varlığı
Duyarlılık	%96,4	%95,7	%93,6	> %99,9
2 Taraflı %95 GA	(%86,4, %98,9)	(%68,3, %99,4)	(%64,1, %98,9)	(%99,9, > %99,9)
Özgüllük	%99,9	> %99,9	> %99,9	> %99,9
2 Taraflı %95 GA	(%99,8, > %99,9)	(%99,9, > %99,9)	(%99,9, > %99,9)	(%99,7, > %99,9)

Tablo 18’de, amaçlanan kullanım popülasyonu ile uyumlu şekilde simüle edilen ikiz gebelik popülasyonunda trizomi 21, 18, 13 ve Y varlığını saptama konusunda VeriSeq NIPT Solution v2 duyarlılığına ve özgüllüğüne ilişkin nokta tahminleri ve tahmini %95 güven aralıkları sunulmaktadır. Güven aralıkları, ilgili trizomiye göre etkilenmiş ya da etkilenmemiş olarak sınıflandırılan KK başarılı klinik ikiz numunelerinin sayısına göre tahmin edilmiştir. Duyarlılık hesaplamasında, etkilenmiş ikiz gebeliklerin üçte ikisinin bir etkilenmiş ikizle dizigotik olduğu ve etkilenmiş ikiz gebeliklerin üçte birinin her ikisi de etkilenmiş ikizlerle monozigotik olduğu varsayılmaktadır.

Tablo 18’de yer alan tahminler yalnızca ikiz gebeliklerle ilgilidir. Daha da düşük prevalans nedeniyle daha yüksek sayılı gebeliklere (üçüz veya daha fazla) ilişkin veriler, anöploidi saptama doğruluğunun tahmin edilebileceği uygun istatistik modelleri oluşturmak için yetersiz olmuştur.

Analitik Performans

Kesinlik

Test kesinliğini değerlendirmek ve miktar tayini yapmak için, VeriSeq NIPT Solution ile daha önce gerçekleştirilen iki çalışmadan elde edilen veriler VeriSeq NIPT Solution v2 analiz ardışık düzen yazılımı kullanılarak yeniden analiz edilmiştir:

- Toplam dokuz çalıştırma için tek bir reaktif lotu ile üç merkez genelinde üç operatör tarafından gerçekleştirilen üçer çalıştırmadan oluşan Çok Merkezli Tekrarlanabilirlik çalışması.
- İki ML STAR, iki sekanslama cihazı sistemi ve üç sekanslama reaktif lotu ile tek bir merkezde 12 çalıştırmadan oluşan Laboratuvar İçi Kesinlik çalışması.

Kesinlik çalışmasının hedefi, trizomi 21 (T21) ve Y Kromozomu açısından testin kesinliğini belirlemek ve farklı cihazlar, kütüphane hazırlama kitleri ve sekanslama reaktif lotları arasındaki değişkenliği tahmin etmektir. Yukarıda açıklanmayan durumlara ilişkin tekrarlanabilirlik, çalışmalar kapsamında değerlendirilmemiştir.

Hamile kadınlardan (T21'den etkilenen fetüsü olan) alınan maternal plazmadan ekstrakte edilen cfDNA ile hamile olmayan kadınlardan alınan plazmadan ekstrakte edilen cfDNA birleştirilerek %5'lik fetal fraksiyon T21 havuzu oluşturulmuştur. Ayrıca %10 fetal fraksiyon maternal erkek (XY fetüsü) cfDNA havuzu da oluşturulmuştur. Her bir çalıştırmaya ilişkin her çalışma için numune paneli, %5'lik fetal fraksiyon T21'den etkilenen numune havuzunun 4 kopyasını ve %10'luk fetal fraksiyon maternal erkek cfDNA havuzunun 20 kopyasını içermiştir. Testler birleştirilmiş iki çalışma için 10 gün boyunca toplam 21 çalıştırma yapılarak gerçekleştirilmiştir.

T21 ve Y kromozomu varlığı, anomali saptama karmaşıklığı ve klinik durumların temsil edilebilirliğine göre değerlendirme için seçilmiştir. En küçük insan otozomu olarak 21. kromozomun boyutu, tıpkı bu çalışmada kullanılanlar gibi özellikle düşük fetal fraksiyon değerlerinde T21 saptama duyarlılığı üzerinde doğrudan etkiye sahiptir. Maternal plazmada mevcut olan Y kromozomu sadece fetal kaynaklıdır ve dolayısıyla testin saptaması daha kolaydır.

21. Kromozom LLR Skoru için gözlemlenen ortalama ve standart sapmalar ile Y Kromozomu normalleştirilmiş kromozomal değerleri (NCV), kopya standart sapmasının (SS) en büyük değişkenlik kaynağı olduğunu göstermiştir. [Tablo 19](#) ve [Tablo 20](#)'de Toplam SS ve Kopya SS arasındaki fark ile gösterildiği şekilde, merkezler, cihazlar ve reaktif lotları arasındaki değişkenlik anlamlı olmayan düzeyde değişkenlik artışına neden olmuştur.

Tablo 19 Çok Merkezli (Tekrarlanabilirlik) Sekanslama Yanıtı Standart Sapma (SS) Özeti

Yanıt	N	Ortalama	Kopya SS	Toplam Tekrarlanabilirlik SS*
21. Kromozom LLR Skoru	36	34,43	11,36	11,36
Y Kromozomu NCV	180	190,56	7,96	10,20

* Toplam değer; merkez, operatör, çalıştırma, gün ve kopya nedeniyle değişkenlik içerir.

Tablo 20 Laboratuvar İçi Sekanslama Yanıtı Kesinlik Özeti

Yanıt	N	Ortalama	Kopya SS	Laboratuvar İçi Toplam SS*
21. Kromozom LLR Skoru	48	36,01	9,07	10,25
Y Kromozomu NCV	240	198,68	7,63	7,82

* Toplam değer; sekanslama cihazı, reaktif lotu, operatör, çalıştırma, gün ve kopya nedeniyle değişkenlik içerir.

VeriSeq NIPT Solution v2 sekanslama kesinliğini (toplam standart sapma) karşılaştırmak üzere flow cell versiyon 2.0 ile versiyon 2.5'in karşılaştırmalı olarak kullanıldığı ek bir çalışma yapılmıştır. Çalışmaya; tek bir merkezde toplam 48 çalıştırma için kombinasyon başına iki sekanslama çalıştırması, iki flow cell (akış hücresi) türü (v2.0 ve v2.5), üç sekanslama kiti lotu ve dört cihaz sistemi dahil edilmiştir. Manuel olarak hazırlanan cfDNA plakalarından bir sekanslama havuzu hazırlanmıştır. Numune paneli, %5'lik fetal fraksiyon T21'den etkilenen numune havuzunun 4 kopyasını ve %10'luk fetal fraksiyon maternal erkek (XY fetüsü) cfDNA havuzunun 20 kopyasını içermiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçlar [Tablo 21](#)'de sunulmaktadır ve flow cell v2.5'e karşı flow cell v2.0 kullanıldığında sekanslama kesinliğinde hiçbir fark olmadığını desteklemektedir.

Tablo 21 Flow Cell v2.0 ve Flow Cell v2.5 Sekanslama Yanıtı Kesinlik Karşılaştırması Özeti

Yanıt	Versiyon Başına Gözlem Sayısı	v2.0 Toplam SS*	v2.5 Toplam SS*	İstatistik Sonucu**
21. Kromozom LLR Skoru	96	9,56	8,44	İstatistiksel Eşdeğer (p-değeri=0,25)
Y Kromozomu NCV	480	7,74	7,38	İstatistiksel Eşdeğer (p-değeri=0,38)

* Toplam değer; sekanslama cihazı, reaktif lotu, çalıştırma, gün ve kopya nedeniyle değişkenlik içerir

**Değişken eşitliği için F testi temel alınır (standart sapma karesi)

Çapraz Kontaminasyon

Çapraz kontaminasyon, VeriSeq NIPT Solution numune hazırlama iş akışında değerlendirilmiştir. Gebe olmayan kadınlardan (XX) ve yetişkin erkeklerden (XY) alınan plazma havuzları, 4 plaka genelinde 96 kuyulu plaka biçiminde bir dama tahtası modelinde test edilmiştir. Toplam 192 kadın ve 192 erkek numune için plaka başına her kadın ve her erkek numune için N = 48. Kadın numunelerden hiçbiri tahmini arka plandan istatistiksel olarak daha yüksek Y kromozomu kapsamı göstermemiştir. Bu da aynı plaka içerisindeki erkek numunelerden çapraz kontaminasyon olmadığını gösterir. VeriSeq NIPT Solution'da saptanabilir çapraz kontaminasyon gözlemlenmemiştir.

Potansiyel Olarak Enterferan Maddeler

Potansiyel olarak enterferan maddelerin etkisi, söz konusu maddelerin varlığında testin performansı incelenerek VeriSeq NIPT Solution'da değerlendirilmiştir.

Albumin, bilirubin, hemoglobin ve trigliseritlerin (endojen) her biri etkilenmeyen kız (XX fetüsü) gebeliklerinden elde edilen maternal plazma havuzlarına eklenmiştir. Her bir test maddesi için iki konsantrasyonda test edilmişlerdir (her biri için n=16). Testin gerçekleştirilmesinde hiçbir enterferans gözlemlenmemiştir.

Tablo 22 Potansiyel Olarak Enterferan Maddeler (endojen)

Test Maddesi	Düşük Test Konsantrasyonu (mg/ml)	Yüksek Test Konsantrasyonu (mg/ml)
Albumin	35	50
Bilirubin	0,01	0,15
Hemoglobin	100	200
Trigliserit	1,5	5

Plazmada doğal olarak görülen maternal genomik DNA (gDNA) fetal cfDNA ile birlikte ekstrakte edilebileceğinden test performansına potansiyel olarak enterferans oluşturabilir. Her numune için 1,6, 3,3 ve 4,9 ng genomik DNA seviyesi (tam kanın 7 gün boyunca saklanmasından sonra ortalama beklenen gDNA konsantrasyonunun üzerinde 1, 2 ve 3 standart sapmaya denk gelir¹²) etkilenmemiş kız (XX fetüsü)

gebeliklerinden alınan maternal plazmadan ekstrakte edilen cfDNA'ya eklenmiştir. Daha sonra numuneler VeriSeq NIPT Solution ile test edilmiştir (her bir konsantrasyon için n=16). Yüksek gDNA düzeylerinin varlığında test performansında hiç enterferans gözlemlenmemiştir.

Gebelik sırasında sıklıkla kullanılan veya reçete edilen yirmi ilaç tabanlı potansiyel olarak enterferan madde (eksojen) EP7-A2 (Klinik Kimyada Enterferans Testi; Onaylı Kılavuz- İkinci Baskı) uyarınca test edilmiştir. 20 potansiyel enterferan dört havuzda birleştirilmiş, etkilenmemiş kız (XX fetüs) gebeliklerinden alınan maternal plazmaya eklenmiş ve VeriSeq NIPT Solution ile test edilmiştir (her havuz için N=16). Bu eksojen maddelerin varlığında test performansında hiç enterferans gözlemlenmemiştir.

Tablo 23 Potansiyel Olarak Enterferan Maddeler (eksojen)

Havuz 1	Havuz 2	Havuz 3	Havuz 4
Asetaminofen	Difenhidramin	Albuterol	Setirizin
Asetilsistein	Eritromisin	Bupropion	Dekstrometorfan
Bizoprolol	Guaifenesin	Kafein	L-Askorbik asit
Sitalopram	Heparin	Sertralin	Metoprolol
Dezloratadin	Lidokain	Sodyum florür	Nadolol

Saptama Sınırı

Saptama Sınırı (LOD), T21 gibi ilgilenilen bir durumun %95 saptama olasılığına karşılık gelen fetal fraksiyon düzeyi olarak tanımlanır. Çeşitli yaygın durumlar için VeriSeq NIPT Solution v2'nin LOD değerini değerlendirmek amacıyla çalışmalar ve istatistiksel analizler gerçekleştirilmiştir.

VeriSeq NIPT Solution v2 ile işlenen etkilenmiş bir numunedeki ilgili durumun saptanma olasılığı temel olarak üç faktöre bağlıdır:

- Fetal fraksiyon
- Sekanslama derinliği
- İlgilenilen genom bölgesinin boyutu ve karmaşıklığı

Sekanslama derinliğinin sabit olduğu varsayıldığında, daha düşük fetal fraksiyon yüzdesine sahip numuneye kıyasla daha yüksek fetal fraksiyon yüzdesine sahip numunede belirli bir sapmanın saptanması daha kolaydır. Bunun tersine, fetal fraksiyonun sabit olduğu varsayıldığında, daha düşük sekanslama derinliğine sahip numuneye kıyasla daha yüksek sekanslama derinliğine sahip numunede belirli bir sapmanın saptanması daha kolaydır. Son olarak fetal fraksiyonun ve sekanslama derinliğinin sabit olduğu varsayıldığında, daha küçük veya daha karmaşık genom bölgelerindeki sapmaların daha büyük veya daha az karmaşık genom bölgelerindeki sapmalara göre saptanması daha zordur.

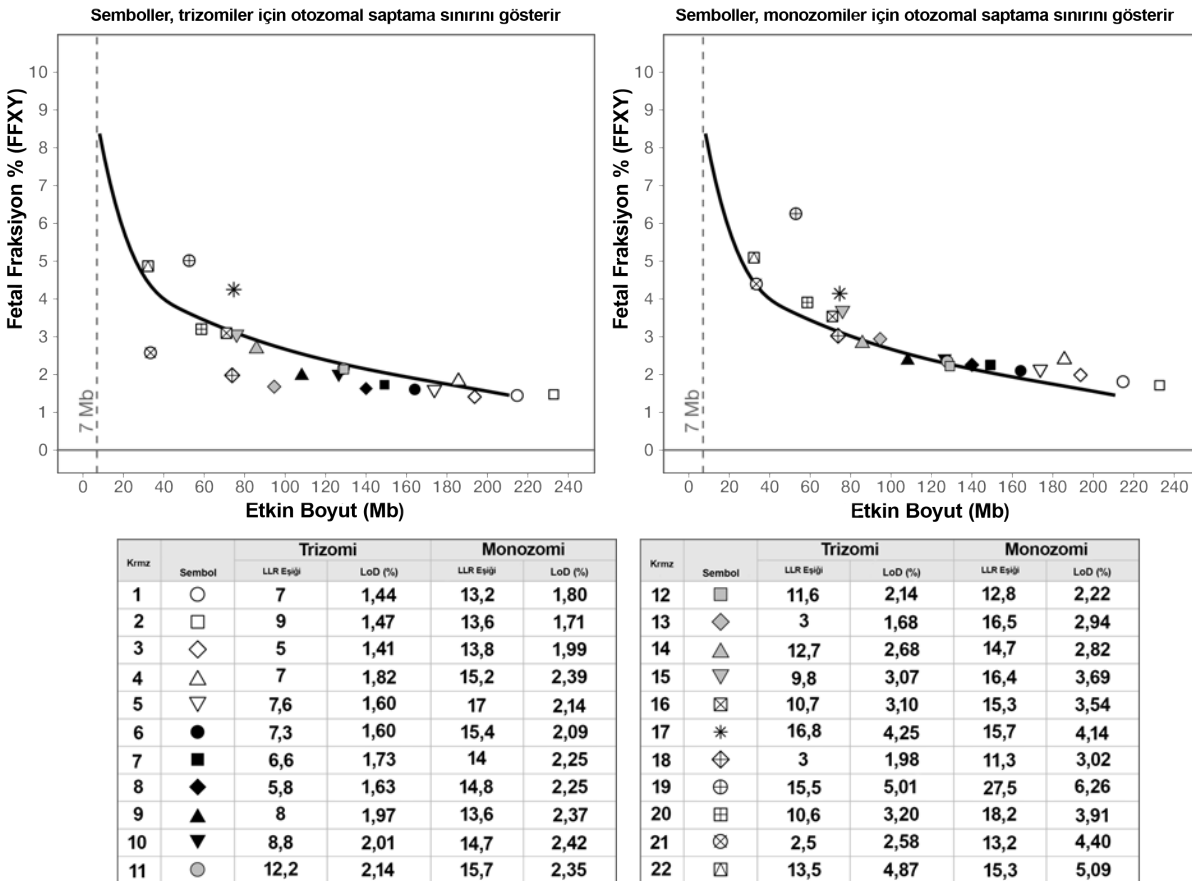
T21 saptaması için LOD değerini belirlemek üzere, havuzlanan T21 numunelerinin ve havuzlanan etkilenmemiş numunelerin karışımlarından oluşan numuneler analiz edilmiştir. İki analit türü, yedili fetal fraksiyon düzeyi seti (%0, %2, %3, %4, %5, %6 ve %10) oluşturacak şekilde bir titrasyon serisi aracılığıyla karıştırılmıştır. Her bir düzey toplam 10 kopya ile temsil edilmiştir.

LOD analizi için fetal fraksiyon kılavuzunun çözünürlüğünü daha fazla artırmak amacıyla, bu çalışmadan elde edilen veriler in silico seyreltmeden elde edilen veriler ile birleştirilmiştir. Deneysel seyreltme ve titrasyonun etkileri, sekanslama verilerinin kontrollü bir şekilde karıştırılmasıyla simüle edilmiştir. Bu in silico titrasyondan elde edilen veriler her bir düzey için 32 kopya ile 14 fetal fraksiyonu düzeyinden (%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 ve %4,50) oluşan bir seti kapsamıştır. T21 için LOD değerini belirlemek üzere, elde edilen veriler üzerinde bir probit analizi gerçekleştirilmiştir.

Herhangi bir numunedeki herhangi bir sapmaya ilişkin saptama olasılığını tahmin etmek üzere fetal fraksiyon, sekanslama derinliği ve genom boyutu/karmaşıklığı kullanılarak bağımsız şekilde bir istatistik modeli geliştirilmiştir. Bu model 1405 XY numunesinden oluşan bir sete karşılık gelen verilerden oluşturulmuştur. Bu model ile tahmin edildiği şekilde T21 için LOD değerinin yukarıda açıklanan probit temelli tahmin ile uyumlu olduğu belirlenmiştir. Bu istatistik modeli, tüm otozomlardaki anöploidiler ile parsiyel delesyon ve duplikasyonlara ilişkin LOD değerlerini tahmin etmek için kullanılmıştır.

Şekil 2 ile tüm trizomiler ve tüm monozomiler için otozomal saptama sınırlarına ve boyuta göre ortalama bölgeler için %95 saptama olasılığı gösterilmektedir. CNV LLR Eşiği 15,1.

Şekil 2 VeriSeq NIPT Solution v2 için Boyuta Göre Ortalama Bölgeler için %95 Saptama Olasılıkları



Sorun Giderme

VeriSeq NIPT Solution v2 Sorun Giderme

Hata Modu	Olası Sonuç	Anlamı	Tavsiye Edilen Eylem	Yorumlar
Yetersiz plazma girdisi	Numune KK hatası	Yetersiz plazma hacmi.	Yeniden alın	Plazma hacminin görsel incelemesine göre.
Kan tüpü hatası	Kan katmanlara ayrılmamış	Numuneye santrifüj uygulanmamış.	Santrifüjün başlatıldığından ve tüpün doğru kuvvette döndürüldüğünden emin olun. Numuneyi yeniden alın.	
		Numunenin yanlış şekilde depolanması veya taşınması (numune hemolizi).	Numuneyi yeniden alın.	Dondurulmuş numuneler ayrılmaz. Hatalı taşıma veya depolama koşulları numunenin hemolizine yol açabilir.

Hata Modu	Olası Sonuç	Anlamı	Tavsiye Edilen Eylem	Yorumlar
Numune pıhtısı veya yavaş akış	Plazma kontaminasyonu	Plazma numunesinde önemli ölçüde kontaminasyon varsa bağımsız numuneler bağlama plakasını tıkayabilir.	Numuneyi inceleyin. Tüpte kalan numune kırmızıysa veya süt gibi bulanıksa numuneyi iptal edin ve yeniden alınmasını talep edin. Numune normal görünüyorsa numuneyi yeniden test edin.	
Numune aşırı akışı	Numune aşırı akışı	Numune uygunluğu için her bir tüp yetersiz düzeyde görsel incelemeye tabi tutulmuştur.	Aşırı akıştan etkilenen yakındaki kuyulardaki tüm numuneleri geçersiz kılın.	Numunelerin işlemeden önce hatalı şekilde taşındığını veya depolandığını gösteriyor olabilir. Uygun olmayan numuneleri işlemeden hariç tutun.
Donanım arızası	Donanım arızası	Ekstraksiyon sırasında materyalin yetersiz parçalanması.	Numuneyi yeniden test edin. Kuyu konumunda diğer numunelerle sorun devam ederse Illumina Teknik Destek birimi ile iletişime geçin.	

Hata Modu	Olası Sonuç	Anlamı	Tavsiye Edilen Eylem	Yorumlar
Bağımsız Numune Analizi KK hatası	Sekanslama KK hatası	Olası nedenler: <ul style="list-style-type: none">• Yetersiz genetik girdi• Numune taşınması sırasında hatalı aktarım• Sekanslama reaktifi hatası	Numune Açıklamasını kontrol edin. İlgili plaka konumundaki önceki numunelerin benzer performans gösterip göstermediğini kontrol edin. Numuneyi yeniden test edin.	Yetersiz numune girdisini veya ML STAR'da hatalı aktarımı gösterir. Yetersiz genetik materyal, plazmadaki yetersiz hücresiz DNA'dan veya hücre bazlı DNA'dan kaynaklanabilir ve numunenin sekanslama için aşırı seyrelmesine neden olur.
	Düşük FF veya hariç tutulmayan bölge (NES) sayımı	Doğru raporlama yapmak için yetersiz veri oluşturulmuştur.	Plazmadan yeniden test edin.	
Miktar tayini KK hatası	Başarısız miktar tayini çalıştırması. Seri medyanı minimum değerinde altında	Yetersiz işlem verimi.	Miktar tayini işlemi tekrarlayın. Tekrarlanan işlem başarısız olursa Illumina Teknik Destek birimi ile iletişime geçin.	Geçer değer altındaki standart eğrisi metrikleri, kütüphane hazırlama ile ilgili sorunları (yani biyolojik sınıf olmayan etanol kullanımı) veya miktar tayini işlemi ile ilgili sorunları gösterir.
	Başarısız miktar tayini çalıştırması	Standart eğrisi hatası.	Miktar tayini işlemi tekrarlayın. Tekrarlanan işlem başarısız olursa Illumina Teknik Destek birimi ile iletişime geçin.	
Başarısız havuzlama	Numune havuzlaması tamamlanamadı	Havuzlama analizi doğru havuz hacimlerini hesaplayamıyor.	Hedef havuz konsantrasyonunu yeniden değerlendirin. Havuzlama analizini yeniden çalıştırın.	

VeriSeq NIPT Microlab STAR Sorun Giderme

İşlem Adımı	Hata Kodu	Hata İletişimi	Açıklama	Kullanıcı Çözümü
Seri Oluşturma	EM0044	The Batch ID entered contains forbidden characters. (Girilen Seri No yasaklı karakterler içeriyor.)	VeriSeq NIPT Solution v2 tüm veri alanları için yalnızca sayıları, harfleri, alt çizgileri ve kesik çizgileri kabul eder.	Özel karakter içermeyen bir ad kullanarak seriyi yeniden adlandırın.
Seri Oluşturma	EM0051	The Batch ID is greater than 36 characters in length. (Seri Numarasının uzunluğu 36 karakterden fazla.)	VeriSeq NIPT Solution v2 seri adlarının uzunluğu en fazla 36 karakterle sınırlıdır.	36 karakterden daha kısa bir ad kullanarak seriyi yeniden adlandırın.
Seri Oluşturma	EM0076	Unable to connect to VeriSeq Onsite Server v2. (VeriSeq Onsite Server v2 bağlantısı kurulamıyor.)	VeriSeq Onsite Server v2, Workflow Manager'dan gelen veri taleplerine yanıt vermiyor.	<ol style="list-style-type: none">1. ML STAR'ın ağa bağlı olduğundan emin olun.2. VeriSeq Onsite Server v2'nin açık olduğundan emin olun.3. ML STAR'ın VeriSeq Onsite Server v2'ye bağlanabilir durumda olduğunu (ping talebi aracılığıyla) kontrol edin.4. Yukarıdaki adımlar sorunu çözmezse Illumina Teknik Destek birimi ile iletişime geçin.
Seri Oluşturma	EM0118	This batch has been failed and cannot be further processed. (Bu seri başarısız oldu ve artık işlenemiyor.)	Belirtilen seri başarısız olmuştur ve artık işlenemez.	VeriSeq Onsite Server v2'deki seri kaydı, seçili serinin başarısız olduğunu belirtir. Daha fazla işlemeye izin verilmez. Gereken numunelerle başka bir seri oluşturun.

İşlem Adımı	Hata Kodu	Hata İletişimi	Açıklama	Kullanıcı Çözümü
Seri Oluşturma	Geçerli değil	This batch has already completed processing. Would you like to repool? (Bu seri işlemeyi tamamladı. Yeniden havuzda toplamak ister misiniz?)	Belirtilen seri havuzlama yoluyla işlenmiştir. İzin verilen tek işleme, yeniden havuzda toplamaktır.	Aşağıdaki şekilde yeniden havuzlayın. <ul style="list-style-type: none">• Re-Pool (Yeniden Havuzla) ögesini seçin.• Yöntemi iptal edin ve yeniden havuzlamadan önce seri adının doğru olduğundan emin olun.
Plazma İzolasyonu	WP0087	Duplicate sample barcodes loaded. (Tekrarlayan numune barkodları yüklendi.)	Aynı barkoda sahip numuneler sisteme yüklenmiştir.	<ol style="list-style-type: none">1. Hangi numunelerin tekrarladığını belirlemek için Workflow Manager'daki istemleri uygulayın.2. Tekrarlayan öğeleri çıkarın ve yeniden etiketleyin ya da değiştirin.3. Numuneleri yeniden yükleyin.
Plazma İzolasyonu	EP0102	Samples specified in the Sample Sheet were not loaded. (Numune Sayfasında belirtilen numuneler yüklenmedi.)	Numune sayfasında yer alan numuneler yüklenen barkodlara dahil edilmemiştir.	<ol style="list-style-type: none">1. Eksik numuneleri belirlemek için Workflow Manager'daki istemleri uygulayın.2. Aşağıdaki seçeneklerden birini gerçekleştirin:<ul style="list-style-type: none">• Eksik numuneleri seriye ekleyin ve numuneleri tekrar yükleyin.• Yöntemi iptal edin, numune sayfasını gerektiği gibi değiştirin. Yöntemi yeniden başlatın.
Plaka Yükleme	Geçerli değil	Venus Barcode Mask Error (Venus Barkod Maskesi Hatası)	Workflow Manager, Venus barkod maskelerini kullanarak doğru plaka-seri ilişkisinin kurulmasını gerektirir.	<ol style="list-style-type: none">1. Plaka yerleşimini kontrol ederek plaka düzeninin doğruluğundan emin olun.2. Yüklenen plakanın belirtilen seri için doğru plaka olduğundan emin olun.

İşlem Adımı	Hata Kodu	Hata İletişimi	Açıklama	Kullanıcı Çözümü
cfDNA Ekstraksiyonu	WE0150	Pressure in the vacuum chamber is too low. (Vakum haznesindeki basınç çok düşük.)	Dingin vakum hattı basınç algısı < 400 Tor ise Workflow Manager devam etmeyecektir.	1. Vakum hattında bükülme veya başka tıkanıklıklar olup olmadığını kontrol edin. 2. Atık hattı tahliye kelepçesini açın, basıncın boşalmasını sağlayın ve ardından tahliye hattı kelepçesini tamamen kapatın. 3. Vakum kontrol cihazının ve pompanın açık olduğundan emin olun. 4. Vakum atık şişesini kontrol edin. Atık şişesinin yarısından fazlası doluysa atık şişesini boşaltın. 5. Sorun devam ederse, Illumina Teknik Destek birimi ile iletişime geçin.
cfDNA Ekstraksiyonu	WE0153	Pressure in the vacuum chamber is too high. (Vakum haznesindeki basınç çok yüksek.)	Basınç kontrolünü başlatmadan önce ölçülen vakum basıncı çok yüksekse sistem arızalanmış olabilir.	Kontrol cihazının arkasındaki tüm vakum bağlantılarının ve hatlarının güvenli olduğundan emin olun.

İşlem Adımı	Hata Kodu	Hata İletişimi	Açıklama	Kullanıcı Çözümü
cfDNA Ekstraksiyonu	WE0996	Vacuum failed to seal. (Vakum kapatılamadı.)	Devam etmeden önce kapak arızası tamamen çözümlenmelidir.	<p>OK (Tamam) ögesini seçmeden önce kapak hatasının çözümlendiğini doğrulayın.</p> <ol style="list-style-type: none">Bağlama plakasının vakum manifolduna yanaştırıldığından emin olun. Elinizde eldiven varken kuvvetli bir biçimde bağlama plakasına bastırın.Vakum gürültüsünü dinleyin ve suyun bağlama plakasından akışını gözlemleyin.Workflow Manager'da izleme görünümünü açın. Gerçek basınç okuması ortam okumasının en az 50 basınç birimi altına ulaştıktan sonra, cfDNA Ekstraksiyonu işlemine devam etmek için OK (Tamam) ögesini seçin.Gerekli basınç okumasına tahsis edilen sürede ulaşılmazsa ilk lizat yüklemesine geçmek için OK (Tamam) ögesini seçin.Lizat, bağlama plakasına dağıtıldıktan sonra yöntemi duraklatın. Bağlama plakasını yeniden yerleştirin ve kuvvetli bir biçimde bastırın.Lizat plakadan akamazsa, Illumina Teknik Destek birimine e-posta gönderin.

İşlem Adımı	Hata Kodu	Hata İletişimi	Açıklama	Kullanıcı Çözümü
cfDNA Ekstraksiyonu	WM0219	If Vacuum is on, manually rest the pump. (Vakum açıksa manuel olarak pompayı duraklatın.)	Ekstraksiyon işlemi sırasında bir yöntem iptal edildikten sonra vakum açık kalabilir.	1. Vakum Kontrol Cihazından vakumu kapatmak için Power (Güç) düğmesine basın. 2. 10 saniye bekleyin ve ardından tekrar Power düğmesine basarak vakumu açın.
cfDNA Ekstraksiyonu	EE0477	An error has occurred while moving a plate. (iSWAP error) (Plaka taşınırken bir hata oluştu.) (iSWAP hatası)	iSWAP hatasıyla (plakanın düşmesi, alınamaması ve benzeri) karşılaşılması halinde sistem, plaka taşıma işlemini manuel olarak tamamlamanız için sizi yönlendirir.	Plakanın kurtarılabilir olduğundan (dökülen malzeme olmadığından) emin olun. <ul style="list-style-type: none">• Plaka kurtarılabilir durumda değilse çalıştırmayı iptal edin.• Plaka kurtarılabilir durumdaysa plaka aktarımını manuel olarak tamamlamak için görüntülenen talimatları uygulayın.
cfDNA Ekstraksiyonu	EE0519	Scanned barcode does not match Binding Plate barcode on record. (Taranan barkod kayıttaki Bağlama Plakası barkoduyla eşleşmiyor.)	Yüklenen Bağlama plakası, çıkarılan plakanın barkoduyla eşleşmiyor.	Yüklenen barkodun kayıtlı barkodla eşleştiğinden emin olun (beklenen barkodun izleme günlüğüne bakın).

İşlem Adımı	Hata Kodu	Hata İletişimi	Açıklama	Kullanıcı Çözümü
API	EA0372	Unable to connect to the data server. (Veri sunucusuna bağlanamıyor.)	VeriSeq Onsite Server v2, Workflow Manager'dan gelen veri taleplerine yanıt vermiyor.	1. ML STAR'ın ağa bağlı olduğundan emin olun. 2. VeriSeq Onsite Server v2'nin açık olduğundan emin olun. 3. ML STAR'ın VeriSeq Onsite Server v2'ye bağlanabilir durumda olduğunu (ping talebi aracılığıyla) kontrol edin.
	EA0774	Connection Error. The API server connection failed to validate. (Bağlantı Hatası. API sunucusu bağlantısı doğrulanamadı.)	VeriSeq Onsite Server v2, Workflow Manager veri taleplerine yanıt vermeyi durdurdu.	Aşağıdakilerden emin olun: 1. ML STAR'ın ağa bağlı olduğundan emin olun. 2. ML STAR'ın VeriSeq Onsite Server v2'ye bağlanabilir durumda olduğunu (ping talebi aracılığıyla) kontrol edin. 3. VeriSeq Onsite Server v2'nin açık olduğundan emin olun.
	EA0780	403: Invalid Request The current transaction is not valid. (403: Geçersiz Talep. Mevcut işlem geçerli değil.)	Gönderilen veri sistem iş akışı mantığını ihlal ediyor.	Daha fazla bilgi için hata ayrıntılarına bakın. Yaygın nedenler arasında girdilerin çok uzun olması veya kabul edilebilir karakter listesinin ihlali yer alır.

Referanslar

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

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

Revizyon Geçmişi

Belge	Tarih	Değişiklik Açıklaması
Belge No 1000000078751 v09	Nisan 2024	<p>Çıkarılanlar</p> <ul style="list-style-type: none">Eski parça no 20030577.Kan toplama tüpü santrifüjü için maksimum tüp kapasitesi gerekliliği. <p>Eklenenler</p> <ul style="list-style-type: none">VeriSeq Onsite Server v2 için yeni parça no 20101927.10 ml kan toplama tüpleri için boyut birimi.SoftMax Pro'nun uyumlu versiyonlarına ilişkin açıklama.VeriSeq NIPT Microlab STAR ile birbirinin yerine kullanım için yalnızca uyumlu plastik malzemelerin kullanılması gerektiğini belirten açıklama notu.Sonuçların Yorumlanması bölümünde, numune katkı maddesi uyarısına ilişkin not.Streck Cell-Free DNA BCT'te toplanan tam kan numunesinin dondurulmamasına yönelik dikkat ifadesi.Numunenin yüksek sıcaklıklara maruz kalmasının önlenmesine yönelik dikkat ifadesi.Test kısıtlamaları ve tekrarlanabilirlik koşulları hakkında açıklama.Saptama Sınırı bölümü, Şekil 2'de CNV LLR Eşiğine ilişkin açıklama. <p>Güncellenenler</p> <ul style="list-style-type: none">Uyumlu reaktif tüpü referansı Roche Reagent Tub yerine Illumina Reagent Tub olarak güncellendi ve yeni parça numarası eklendi.Thermo Fisher Multifuge X4 Pro-MD katalog parça numarası, "no 75016034" olarak güncellendi.Tutarsız kuyu hacimlerinin, numunelerin otomatik KK adımıyla başarısız olmasına neden olabileceğine ilişkin dikkat ifadesi.Cihaz kullanım talimatlarına referans.
Belge No 1000000078751 v08	Ağustos 2022	<p>İş akışı parça numarası güncellendi</p> <p>Kütüphane plakası dondurulmuşsa karıştırmak için pipetlenmesine yönelik talimat çıkarıldı.</p>

Belge	Tarih	Değişiklik Açıklaması
Belge No 1000000078751 v07	Mayıs 2022	<p>Prosedür Kısıtlamaları, ilk iki maddeyi içerecek şekilde VeriSeq NIPT Solution v2 Raporlama bölümü olarak bölündü. Kalan metin, Test Kısıtlamaları başlıklı yeni bir bölüme dahil edildi.</p> <p>Çıkarılanlar</p> <ul style="list-style-type: none"> Tüm reaktif etiketlerinden VeriSeq çıkarıldı. Kütüphaneleri Hazırlama hazırlığında VeriSeq NIPT Adapter Plate'e plaka barkodu yapıştırma adımı. <p>Eklenenler</p> <ul style="list-style-type: none"> DNaz/RNaz içermeyen su ifadesine "sertifikalı" sözcüğü eklendi. Aşağıdaki mikroplaka okuyuculardan biri veya eşdeğeri ifadesi; SpectraMax M2, M3, M4, M5 ifadesi ve not eklendi. VeriSeq NIPT Microlab STAR bölümüne hata işleme olayı sırasında yapılacakların açıklaması eklendi. Kuyuları görsel olarak inceleme notu. Protokol bölümleri boyunca 24 ve 48 numunelik serilere ilişkin talimatlar. Mor adaptör plakasını veya eşdeğerinin kullanılacağı durumlardaki adımlar. Demografikler ve Gebelik Özellikleri bölümüne birinci trimestre gebelik sonuçlarını dahil etmek üzere ifade. Derin Kuyulu plaka spesifikasyonlarına tork dirençli ifadesini dahil etmek üzere madde. <p>Güncellenenler</p> <ul style="list-style-type: none"> Açıklama sağlamak ve örnek vermek için benzersiz seri adlarına ilişkin ifade. Not, Dikkat ve Uyarı ifadelerine ilişkin semboller ve biçimlendirme. Test alt maddelerinin sonuçları. Guanidin tiosiyanat, guanidin hidroklorür olarak. CVS, BVS (Temel Vakum Sistemi) olarak Genom geneli tarama ve LLR skorunu kullanmaya ilişkin ifade. Spesifikasyonlar: Reaktif tüpü spesifikasyonları, derin kuyulu plakalar, 384 kuyulu plakalar, 96 kuyulu plakalar
Belge No 1000000078751 v06	Ağustos 2021	AB Yetkili Temsilcisinin adresi güncellendi.

Belge	Tarih	Değişiklik Açıklaması
Belge No 1000000078751 v05	Aralık 2020	<p>Ruhsatlandırma taleplerini yerine getirmek amacıyla Prosedür İlkeleri, Uyarılar ve Önlemler ve Ürün Etiketi bölümleri ek açıklamalarla güncellendi.</p> <p>Geçerli Illumina stiline ve düzenine uyum sağlaması amacıyla protokoldeki içerik üzerinde ufak güncellemeler yapıldı.</p> <p>Analitik Performans, Kesinlik bölümünde 21. kromozoma ilişkin “en küçük ikinci insan otozomu” açıklaması, “en küçük insan otozomu” olarak düzeltildi.</p> <p>Plazma İzolasyonu Hazırlığı ve Sonuçların Yorumlanması bölümlerine, haznelerin hatalı kullanımı ve numune karışması riskleri hakkında dikkat ifadeleri eklendi.</p> <p>Yeni sunucu modeli ve yazılım parça numarası güncellemeleri sürümü için yeni sunucu ve yazılım parça numaraları eklendi.</p> <p>Numune aşırı akışını çözmek ve önlemek için protokol ve sorun giderme bilgilerine dikkat ifadeleri eklendi.</p> <p>Güvenlik Veri Sayfası ile uyum sağlanması için Accessory Box'ta reaktifin DNA Miktar Tayini Standardında yer alan aktif bileşenler güncellendi.</p> <p>Diğer belgelerle tutarlılık sağlanması için Local Run Manager VeriSeq NIPT Module'e ilişkin adlandırma kuralları güncellendi.</p> <p>Revizyon geçmişi eklendi.</p>
Belge No 1000000078751 v04	Ekim 2020	Küçük çaplı düzeltmeler.
Belge No 1000000078751 v03	Eylül 2020	Malzeme listesi, laboratuvar donanımının spesifikasyonlarını ve bilinen uyumlu seçenekleri belirtmek üzere güncellendi.
Belge No 1000000078751 v02	Şubat 2020	<p>Temel ve genom geneli tarama türleri arasındaki farkları daha iyi anlatmak üzere Klinik Performans bilgilerinin sunumu güncellendi.</p> <p>Yeni Temel ve Genom Geneli Taramalar Arasındaki Performans Farkları bölümü eklendi.</p> <p>Prosedür İlkeleri bölümünden tamamlayıcı raporun isteğe bağlılığı konusunda çelişkili bilgiler çıkarıldı.</p> <p>Stil tutarlılığının sağlanması için belge boyunca VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 yazılımının adlandırma kuralı güncellendi.</p> <p>Son değişikliklerin yansıtılması için Avustralya ve Illumina Netherlands adreslerinin etiketi güncellendi.</p>

Belge	Tarih	Değişiklik Açıklaması
Belge No 1000000078751 v01	Ağustos 2019	Yazılım hatasının yayınlanması nedeniyle cfDNA Ekstraksiyonu bölümündeki mükerrer adım çıkarıldı.
Belge No 1000000078751 v00	Mayıs 2019	İlk sürüm.

Patentler ve Ticari Markalar

Bu belge ve içindekiler Illumina, Inc. ve bağlı şirketlerinin ("Illumina") mülkiyetinde olup yalnızca işbu belgede açıklanan ürünün/ürünlerin kullanımıyla bağlantılı olarak müşterisinin sözleşmeye ilişkin kullanımı içindir. Bu belge ve içindekiler Illumina'nın önceden yazılı izni olmaksızın başka hiçbir amaçla kullanılamaz veya dağıtılamaz ve/veya hiçbir şekilde iletilemez, ifşa edilemez ya da kopyalanamaz. Illumina bu belge ile patenti, ticari markası, telif hakkı veya genel hukuk hakları ya da üçüncü tarafların benzer hakları kapsamında hiçbir lisansı devretmez.

Bu belgede açıklanan ürünün/ürünlerin uygun ve güvenli bir şekilde kullanılması için nitelikli ve uygun eğitim almış çalışanlar bu belgedeki talimatları tam olarak ve açık bir şekilde uygulamalıdır. Söz konusu ürün/ürünler kullanılmadan önce bu belgedeki tüm bilgiler tam olarak okunmalı ve anlaşılmalıdır.

BU BELGEDE YER ALAN TÜM TALİMATLARIN TAMAMEN OKUNMAMASI VE AÇIK BİR ŞEKİLDE UYGULANMAMASI, ÜRÜNÜN/ÜRÜNLERİN HASAR GÖRMESİNE, KULLANICI VEYA BAŞKALARI DAHİL OLMAK ÜZERE KİŞİLERİN YARALANMASINA VE DİĞER MALLARIN ZARAR GÖRMESİNE NEDEN OLABİLİR VE ÜRÜN/ÜRÜNLER İÇİN GEÇERLİ OLAN HER TÜRLÜ GARANTİYİ GEÇERSİZ KILAR.

ILLUMINA BU BELGEDE AÇIKLANAN ÜRÜNÜN/ÜRÜNLERİN (ÜRÜNÜN PARÇALARI VE YAZILIMI DAHİL) YANLIŞ KULLANIMINDAN DOĞAN DURUMLARDAN SORUMLU TUTULAMAZ.

© 2023 Illumina, Inc. Tüm hakları saklıdır.

Tüm ticari markalar Illumina, Inc. veya ilgili sahiplerinin malıdır. Özel ticari marka bilgileri için bkz. www.illumina.com/company/legal.html.

İletişim Bilgileri



Illumina, Inc.
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 ABD
+1 800 809 ILMN (4566)
+1 858 202 4566 (Kuzey Amerika dışından)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



Avustralya Sponsoru

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

Ürün Etiketi

Ürün ambalajı ve etiketinde görülebilecek sembollere dair eksiksiz referans için support.illumina.com adresinden kitinize yönelik *Documentation* (Belge) sekmesindeki sembol anahtarına bakın.

Tıbbi Cihazlara İlişkin Avrupa Veritabanı (European Database on Medical Devices, Eudamed) kullanıma sunulduktan sonra <https://ec.europa.eu/tools/eudamed> adresinde bir Güvenlilik ve Performans Özeti (SSP) yer almaktadır. Bu özet, Temel UDI-DI (0081627002NIPTRP) ile bağlantılıdır.