

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 durumu 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 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 kromozomların anormal sayısı olan anöploidi olmak üzere fetal kromozom anormallikleri üreme yetersizliğinin, konjenital anomalilerin, gelişme geriliğinin ve zihinsel engellerin ortak nedenidir. 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, %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 yaşına bağlı olarak %69 ile %96 arasında değişir.⁴ Önemli bir şekilde yaklaşık %5 yalancı pozitif oranına sahiptir ve bu durum onaylama 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 doğrulukla 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 profesyonel tıp kurumu NIPT kullanımına yönelik birtakım endikasyonları destekleyen görüş beyanları 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 en az 10 haftalık hamile olan kadınlardan alınan maternal periferik tam kan numunelerinden türetilen cfDNA parçacıklarını 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 duplikasyonları ve delesyonları ve tüm kromozomlara ilişkin anöploidi durumunu sunar. Her iki tarama türü fetal cinsiyet raporlaması ile veya olmadan cinsiyet kromozomu anöploidisini (SCA) raporlama seçeneği sunar. SCA raporlama seçeneği kapatılabilir. SCA raporlama seçeneği kapatılırsa fetal cinsiyet de raporlanmaz. Cinsiyet raporlaması seçenekleri konusunda daha fazla bilgi için bkz. *VeriSeq NIPT Solution v2 Yazılım 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, 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, kitaplık hazırlama, kitaplık miktar tayini, kitaplık 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 hücresiz DNA Kan Toplama Tüpüne (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.

- **Kitaplık Hazırlama**—Saflaştırılmış cfDNA parçacıkları 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 parçacıkları 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 hatalı sonuçlara yol açabilecek çapraz kontaminasyonunu önlemek için çok dikkat edin.

- 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 kitaplık yakalamaya olanak sunan sekanslar içerir.
- **Miktar Tayini**—Kitaplık ürünü miktar tayini DNA standart eğrisine kıyasla belirlenen konsantrasyonda floresan boya kullanılarak yapılır.
- **Kitaplık Havuzlama ve Sekanslama**—Numune kitaplıkları kapsamındaki değişkenliği en aza indirmek için ayarlanan miktarlarda 24 veya 48 numunelik havuzlarda bir arada 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:
 - Kitaplık parçacıklarının dizin sekansına göre tanımlanması ve çift sonlu okumaların insan referans genomuna hizalanması.
 - Kitaplık parçacıklarının hem uzunluklarının hem genom koordinatlarının dağıtımından elde edilen bilgilerin birleştirilmesiyle kitaplığın fetal fraksiyonunun tahmini.
 - Bilinen biaslar hesaba katıldıktan sonra bir istatistik modeli, tahmin edilen fetal fraksiyon düzeyindeki anomali ile tutarlı bir şekilde kitaplıkta 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 Sınırlamaları

Testin Sınırlamaları

- 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 kromozomal anomali olasılığını ortadan kaldırmaz. Negatif bir sonuç gebeliğin farklı kromozomal anormallikleri, genetik durumları veya doğum kusurları (ör. açık nöral tüp defekti) olması olasılığını ortadan kaldırmaz.
- Genom geneli taramalar için, kromozom boyutunun %75'inden az olan önemli ölçüde 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 kanıtına dayalı olarak hücresiz DNA bazlı tarama sonuçları, birtakım maternal ve fetal faktörlerle bozulabilir. Bunların bazıları aşağıda listelenmiştir, ancak aşağıdakilerle sınırlı değildir:
 - Yakın zamandaki maternal kan transfüzyonu
 - Maternal önceki organ nakli/kök hücre nakli
 - Maternal otoimmün hastalık
 - Maternal neoplazmalar (iyi huylu ve kötü huylu)
 - Maternal mosaisizm
 - Maternal kopya sayısı varyasyonları
 - Fetoplazental mosaisizm/plasentaya sınırlı mosaisizm
 - Fetal ölüm/kaybolan ikiz

VeriSeq NIPT Solution v2 Raporlama

- 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'lik 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 (parça no 20030577) aşağıdaki numune hazırlamayı içerir:

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

VeriSeq NIPT Solution v2 (parça no 20030577) 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 veya 20047000) 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) ve 95475-02 (230 V), Hamilton Company Bonaduz: 806288).
- Local Run Manager VeriSeq NIPT modülü (parça no 20044989).

Reaktifler

Temin Edilen Reaktifler

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

VeriSeq NIPT Sample Prep, Ekstraksiyon Kutusu

Tablo 1 VeriSeq NIPT Ekstraksiyon Kutusu (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 | Liyofilize Proteinaz K | 15 °C ila 30 °C |

Tablo 2 VeriSeq NIPT Ekstraksiyon Kutusu (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 | Liyofilize Proteinaz K | 15 °C ila 30 °C |

VeriSeq NIPT Sample Prep, Kitaplık Hazırlama Kutusu

Tablo 3 VeriSeq NIPT Kitaplık Hazırlama Kutusu (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 Kitaplık Hazırlama Kutusu (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, Aksesuar Kutusu

Tablo 5 VeriSeq NIPT Aksesuar Kutusu, Parça No 15066811

| Etiket Üzerindeki Reaktif Adı | Kitteki Kapların Sayısı | Aktif Bileşenler | Depolama |
|---|-------------------------|--|---------------|
| DNA Binding Plate (DNA Bağlama Plakası) | 1 | Değiştirilmiş silikon membranlı propilen mikroplaka | 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, İş Akışı Tüpleri ve Etiketler

Tablo 6 İş Akışı Tüpleri ve Etiketler, Parça No 15071543

| Etiket Üzerindeki Parça Adı | Kitteki Parçaların Sayısı | Depolama |
|---|---------------------------|-----------------|
| Etiket (LBL)–Plaka Barkodu | 9 | 15 °C ila 30 °C |
| Etiket (LBL)–Derin Kuyulu Plaka Barkodu | 12 | 15 °C ila 30 °C |
| 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
- Etanol, %100 (200 proof), moleküler biyoloji sınıfı için

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 sefer kullanım içindir. Reaktifler kullanılmak üzere hazırlandıktan sonra hemen kullanılmalıdır.
3. VeriSeq NIPT Solution bileşenlerinin ambalajı veya içerikleri hasar görmüşse veya bozulmuşsa lütfen Illumina Müşteri Hizmetleri ile iletişim kurun.
4. Reaktifler belirtilen şekilde depolandığında kit etiketlerinde belirtilen son kullanım tarihine kadar stabildir. Depolama koşulları için [Reaktifler, sayfa 5](#) bölümü tablolarında 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 bulaşmayla 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 kitaplıkları en kısa sürede sekanslayın. Havuzlanan kitaplıklar -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 sistemi (NGS): <ul style="list-style-type: none">2 x 36 bp çift sonlu sekanslamaVeriSeq NIPT Sample Prep çift dizin adaptörleriyle uyumluBCL dosyalarının otomatik üretimiİki kanallı kimyaHer çalıştırmada 400 milyon çift sonlu okumaVeriSeq NIPT Assay Software v2 veya bir 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 | |

| Ekipman | Tedarikçi |
|--|--|
| <p>Eşdeğeri:</p> <ul style="list-style-type: none"> Fren seçeneği olmayan 1600 x g kapasiteli soğutmalı santrifüj Kovalı salıncak kovalı rotor Kova eklentileri, 24, 48 veya 96 tüp kapasitesi, 76 mm minimum derinlik 16 x 100 mm kan toplama tüpünü destekleyecek eklenti adaptörleri <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, dörtlü set | <p>Genel laboratuvar tedarikçisi</p> <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 120V TX-1000BT Sorvall Legend XTR Santrifüj HIGHPlate 6000 Mikroplaka Rotoru Rotor yüksek plaka 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>Genel laboratuvar tedarikçisi</p> <p>Thermo Scientific VWR katalog no 76326-254</p> <p>Thermo Fisher Scientific, katalog no 75004521 (120 V) veya katalog no 75004520 (230 V)</p> <p>Thermo Fisher Scientific, katalog no 75003606</p> <p>Thermo Scientific VWR katalog no 97040-244</p> <p>Thermo Fisher Scientific, katalog no 4379590</p> <p>Thermo Fisher Scientific, katalog no AB-0563/1000</p> |
| SoftMax Pro v6.2.2 veya daha yüksek sürümlü 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 insert, iş akışında kullanılmak üzere mikroplaka okuyucu ile birlikte sağlanır | <p>Molecular Devices, parça no XPS</p> <p>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 teknik özelliklerde 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 ya da 20047000 (v2) veya no 15076164 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-SIAgilent, ürün no 201246-100 |
| <p>Aşağıdaki spesifikasyonlara sahip reaktif tüpü:</p> <ul style="list-style-type: none">Konik tabanlı ve 20 ml minimum kapasiteli VeriSeq NIPT Microlab STAR'ın taşıyıcısına sabit bir biçimde ancak güç uygulanmadan oturan tüp.RNaz/DNaz içermeyen polipropilen.Dahili hazne boyutları (sıvı düzeyi) VeriSeq NIPT Microlab STAR'ın otomatik aspirasyon ve dağıtım adımları ile uyumlu olan test reaktifi hacimleri kullanarak sıvı düzeylerini oluşturur.Yükseklik boyutları, VeriSeq NIPT Microlab STAR'ın otomatik hareketleri ile uyumludur. | <p>Genel laboratuvar tedarikçisi</p> <p>Uyumlu tüpler:</p> <ul style="list-style-type: none">Roche, ürün no 03004058001 |
| <p>Aşağıdaki spesifikasyonlara sahip derin kuyu plakaları:</p> <ul style="list-style-type: none">96 piramit veya konik tabanlı kuyu ve 2 ml minimum kapasiteli SLAS 1–2004, 3–2004 ve 4–2004 mikrolaka formatı.Tüm numune temas yüzeyleri için düşük DNA bağlama materyali tercihli yarı saydam polipropilen.Kuyu boyutları VeriSeq NIPT Microlab STAR otomatik aspirasyon ve dağıtım adımları ile uyumlu sıvı düzeyi oluşturur.Plaka barkodlarının güvenli, düz yüzey yapışması ile istenen konuma yerleştirilmesine izin veren plaka eteği.Minimum 5600 x g'ye dayanabilen torka 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 0030505301Eppendorf, parça no 30502302USA Scientific, parça no 1896-2000 |

| Sarf Malzemesi | Tedarikçi |
|---|--|
| <p>Aşağıdaki spesifikasyonlara sahip 384 kuyulu plaka:</p> <ul style="list-style-type: none"> 50 µl minimum kuyu kapasiteli, düşük hacimler için optimize edilmiş, 384 kuyulu mikroplaka. Tüm numune temas yüzeyleri için düşük DNA bağlama ve ışık engelleyici siyah opak polistiren. Kuyu boyutları VeriSeq NIPT Microlab STAR otomatik aspirasyon ve dağıtım adımları ile uyumlu sıvı düzeyleri oluşturur. Plaka yükseklik boyutları, VeriSeq NIPT Microlab STAR'ın otomatik hareketleri ile uyumludur. Plaka barkodlarının güvenli, düz yüzey yapışması ile istenen konuma yerleştirilmesine izin veren 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 yarı saydam kuyu ve minimum 5600 x g'ye dayanabilen torka dirençli çerçeve içeren mikroplaka. 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 düzeyleri oluşturur. Plaka yükseklik boyutları, VeriSeq NIPT Microlab STAR'ın otomatik hareketleri ile uyumludur. Plaka barkodlarının güvenli, düz yüzey yapışması ile istenen konuma yerleştirilmesine izin veren 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 Bio-Rad, 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> |
| Hücresiz 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 |

| Sarf Malzemesi | Tedarikçi |
|---|-------------------------------|
| Eşdeğeri: <ul style="list-style-type: none">Alkol bazlı hızlı dezenfektan spreyDezenfektan deterjan çözeltisi Tavsiye edilen: <ul style="list-style-type: none">Deiyonize su ve %70 etanol | Genel laboratuvar tedarikçisi |

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 Hücresiz DNA BCT’de toplanmalıdır.
- Tam kanın taşınması, etiyolojik maddelerin taşınmasına yönelik yürürlükteki tüm yönetmeliklere uygun olmalıdır. Hızlandırılmış nakliye/taşıma yöntemlerinin kullanılması önerilir.
- Nakliye sırasında 4 °C ila 30 °C'deki sıcaklıklarda depolayın. Numuneler alındıktan sonra işlemeye hazır olana dek 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 depolama sürelerinin aşılması bağımsız numune başarısızlığı oranlarını olumsuz etkileyebilir.

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 hükümet 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 hükümet 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 hükümet 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 hükümet 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.
- Taşıma ve numuneler arası çapraz kontaminasyon riskini azaltmak için aerosole dayanıklı uçlar kullanın.
- Kontaminasyon potansiyeli nedeniyle, kuyu içeriklerinin tamamen kuyuda kaldığından emin olmak için çok dikkat edin. İçerikleri sıçratmayın. Her vorteks adımının ardından santrifüj uygulayın.
- Kan ve kan türevleri kullanırken, doğru laboratuvar uygulaması ve hijyen bakımından yürürlükteki yönetmelikleri izleyin.
- Kitaplık hazırlama sırasında aerosol ağartıcı spreyle kullanmayın. Eser miktarda ağartıcı kontaminasyonu testin başarısız olmasına neden olabilir.
- Herhangi bir plakayı açarken, plakayı sabit düz bir yüzeye yerleştirip plakayı sıkıca tutmaya dikkat edin. Kapağın açığa çıkan kuyular ile temas etmediğinden emin olarak kapağı yavaşça çıkarın. Açığa çıkan kuyulara dokunmamaya ve içeriklerini hareket ettirmemeye dikkat edin. Kuyudan kuyuya çapraz kontaminasyon hatalı sonuçlara neden olabilir.

VeriSeq NIPT Microlab STAR Tablası Temizliği

- Kullanmadan önce, temizlik bakımından tablayı inceleyin. En az haftada bir kez haftalık bakım gerçekleştirin ve bu temizlik talimatlarını izleyin.
- Tüm yüklenemez taşıyıcıları çıkarın ve alkol bazlı hızlı dezenfektan spreyle (Deiyonize su ve %70 etanol) temizleyin ve kurumaya bırakın. Fazla kirlenmişlerse akabinde dezenfektan deterjanına batırın, alkol bazlı dezenfektan ile durulayın ve kurumaya bırakın.
- Ön kapağı açın ve tablayı Deiyonize su ve %70 etanol ile doygun bir bezle silin. Özellikle kaydırma bloklarının temizliği kontrol edilmelidir.
- Temel Vakum Sistemi (BVS) manifoldunu sökün ve BVS manifoldunu, contasını ve iç haznelerini bezle temizleyin. Malzemenin kırılma hale 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 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 etanol ile 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 etanol ile ıslatılmış tiftiksiz bir bezle temizleyin.
- CORE 96 başlı atık kutusunu temizleyin:
 - Deiyonize su ve %70 etanol ile ıslatılmış aynı bezi kullanarak 96 başlı kutunun muhafazasını ve durdurma disklerinin alt kısmını temizleyin.
 - Aynı bezi veya Deiyonize su ve %70 etanol ile 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 kapakları Deiyonize su ve %70 etanol ile spreyleyin ve silerek kurulayın.
- Otomatik yükleme bandını Deiyonize su ve %70 etanol ile ıslatılmış bir bezle temizleyin ve basınç uygulamadan silin.
- Tabla ve bileşenler tamamen kurduğunda taşıyıcıları değiştirin.

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

Kalite Kontrol

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

Bir kontrol numunesinin veya şablonsuz kontrolün çalıştırılması her bir numune hazırlama ile 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 belirtilmedikçe, 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 çok dikkat edin; kapağın alt tarafında görünür sıvı olmamalıdır.
 - Kapağın açığa çıkan alt tarafının açığındaki kuyular ile temas etmediğinden emin olun.
 - Açığa çıkan kuyulara dokunmamaya dikkat edin.
- 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. Plakanın tamamı boyunca basınç uygulandığından ve kapağın her bir kuyu boyunca sıkı olduğundan emin olun.
- Plakayı açmadan önce aşağıdakileri uygulayın:
 - 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 yazılımı arayüzünü takip edin.
- Çalışma sırasında ön kapağı yerinde tutun.
- Çalışma sırasında tüm nesnelere tabladan uzak tutun.
- Bir hata işleme olayında **Exclude** (Hariç tut) seçeneği sunulursa herhangi bir koşul altında bu seçeneği seçmekten kaçının. Yöntem hata işleme olayından sonra işleme devam edemiyorsa ve sınırlı hata işleme seçenekleriniz 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 atmasına olanak sunun. 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 uçlar ile dolu raf yükleyin.

Numuneleri İşleme

Prosedür

1. Her bir alikot için şu adımları tamamlayın:
 - a. Barkodlanmış numuneleri 1600 x g ile 10 dakika boyunca 4 °C sıcaklıkta 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 bir tüpü numune uygunluğu için inceleyin:
 - Numune hacmi beklendiği şekildedir.
 - Kırmızı kan hücreleri ve numunelerin plazma katmanları arasındaki net ayrışma santrifüjleme sonrasında görünürdür.
 - Plazma seviyesi, beyaz kan hücresi tabakasının en az 1,5 ml üzerindedir.
 - Numune yoğun şekilde hemolize değildir (yani, plazma koyu kırmızı görünmüyor).
 - Numune lipemik değildir (yani plazma bulanık beyaz veya süt gibi ve opak görünmüyor).
 - Numunede pıhtılaşma yok.



DİKKAT

Hatalı şekilde depolanan veya taşınan numuneler uygun olmayan duruma gelebilir. İş akışı boyunca uygun olmayan numunelerin işlenmesi halinde bu numuneler ekstraksiyonlar sırasında bağlama plakasını tıkayarak bitişik kuyulara aşırı numune akışına neden olabilir.

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



DİKKAT

Bir hata işleme olayında, Exclude (Hariç tut) seçeneği sunulursa bunu seçmeyin. Yöntem hata işleme olayından sonra işleme devam edemiyorsa ve sınırlı hata işleme seçenekleriniz 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 uçlar ile dolu raf 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 açar.

Prosedür

1. AppLauncher uygulamasını açın ve ardından **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. Sayıları, harfleri, alt çizgileri (_) ve tireleri (-) kullanabilirsiniz. Örneğin: 2025-10-16_Seri3.
Seri Numarası büyük/küçük harf duyarlı değildir. Büyük/küçük harf duyarlı Seri Numaraları benzersiz sayılmaz.
Seri adları benzersiz olmalı ve büyük harfle yazılması dışında farklar içermelidir. Örneğin, Seri01 ve seri 01 seri adları benzersiz değildir. Aynı kural Numune Numarası adlandırmasında geçerlidir.
3. **New Batch** (Yeni Seri) seçeneğini belirleyin.
4. Başlatma işleminin ardından plazma izolasyonunu başlatmak için **OK** (Tamam) ögesini seçin.
5. Aşağıdaki adımlardan birini gerçekleştirin:
 - Mevcut 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 Yazılım 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 seçiyorsanız Workflow Manager Service Tools içinde varsayılan numune değerlerini ayarladığınızdan emin olun. Daha fazla bilgi için bkz. *VeriSeq NIPT Solution v2 Yazılım Kılavuzu (belge no 1000000067940)*.

6. Seri boyutunu seçin ve ardından **OK** (Tamam) ögesini seçin.

7. Şablonsuz kontrollerin sayısını (NTC'ler) 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.
8. Tüm barkodların yapıştırılmış olduğunu teyit edin ve ardından numuneleri, uçları ve plakaları (barkod sağa dönük şekilde) taşıyıcıya yükleyin.
9. Her yükleme komutundan sonra **OK** (Tamam) ögesini seçin.

| Numune Serisi Boyutu | Taşıyıcı Türü | İzleme | Kalem | Alan 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] Şablonsuz kontrol (NTC) için kullanılan Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS) | 5 |

10. Taşıyıcıların, laboratuvar donanımının ve reaktiflerin doğru yüklendiğinden emin olun.
11. Pre-Spin Deck Verification (Döndürme Öncesi Tabla Doğrulama) ekranında **OK** (Tamam) ögesini seçin.
12. Otomatik adımları 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) seçeneğini belirleyin.
15. Ara Plazma derin kuyulu plakasını aşağıdaki şekilde çıkarın.
 - a. Her bir kuyuda tutarlı hacimler olup olmadığı açısından plakayı inceleyin (pipet hataları yok). Beklenen hacim 1000 µl'dir.
 - b. Plazma İzolasyonu işlemi tamamlandığında tüm tutarsızlıkları kaydedin.
 - c. Plakayı kapatın, dengeli bir şekilde yükleyin ve 5600 × g ile 10 dakika boyunca fren kapalı olarak ve en düşük ayardayken santrifüjleyin.

16. Son Plazma Hazırlama prosedürüne ilerlemek için **Yes** (Evet) ögesini seçin.
17. Plaka kapağını açın ve plakayı tekrar taşıyıcıya yükleyin.

| Numune Serisi Boyutu | Taşıyıcı Türü | İzleme | Kalem | Alan 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 adımları 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) seçeneğini belirleyin.
22. Workflow Manager tarafından uyarıldığında, taşıyıcıları ve tablayı boşaltın.
23. Nihai Plazma derin kuyulu plakasını çıkarın.
24. Aşağıdaki hatalar için plakayı inceleyin:
 - Her bir kuyuda tutarsız hacimler. Beklenen hacmin 900 µl olduğunu.
 - Görünür hücre tanecikleri.
 - Aşırı hemoliz.Anormal görünür hücre tanecikleri veya aşırı hemoliz gözlemlerseniz Plazma İzolasyonu yönteminin sonunda etkilenen numuneyi geçersiz kılın veya Seri Yöneticisini kullanın. Seri Yöneticisi hakkında daha fazla bilgi için bkz. *VeriSeq NIPT Solution v2 Yazılım Kılavuzu (belge no 1000000067940)*.
25. Workflow Manager tarafından uyarıldığında **OK** (Tamam) ögesini seçin.
26. Etkilenen kuyular hakkındaki yorumları girin ve ardından **OK** (Tamam) ögesini seçin.
27. Aşağıdaki adımlardan birini gerçekleştirin.
 - cfDNA Ekstraksiyonuna devam etmek için **Yes** (Evet) ögesini seçin.
 - Durdurmak için **Exit** (Çıkış) seçeneğini belirleyin.

GÜVENLİ DURMA NOKTASI

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 onaylamak için Ekstraksiyon ve Aksesuar Kutularını görsel olarak inceleyin.

2. Aşağıdaki reaktifleri hazırlayın. Hazne tüplerini ve derin kuyulu haznelerini reaktiflerin adlarıyla etiketleyin.

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

3. Yavaşça 3,75 ml Proteinaz Tamponunu her bir Proteinaz K reaktif flakonuna 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 serileri için kullanılmayan kuyulara folyo kapak yapıştırın.
14. Vakum sisteminin temizliği için %70 EtOH temizleme çözeltisi (%70 EtOH, %30 DNaz/RNaz içermeyen su) hazırlayın.
15. Vakum sistemini aşağıdaki gibi hazırlayın.
- a. Vakum manifoldunu çıkarın ve %70 EtOH ile temizleyin.
Malzemenin kırılma riskine gelmesine neden olabileceğinden contayı EtOH ile temizlemekten kaçınınız.
 - b. Vakum atık kutusunu boşaltın.
 - c. ML STAR vakum sisteminin açık olduğundan emin olun.

Prosedür

1. cfDNA Ekstraksiyonu başlatmak için **OK** (Tamam) ögesini seçin.
2. **VeriSeq NIPT Method** açık değilse:
 - a. AppLauncher uygulamasını açın ve ardından **VeriSeq NIPT Method** (VeriSeq NIPT Yöntemi) ögesini seçin.
 - b. Seri Numarasını ve kullanıcı adını girin ve ardından **OK** (Tamam) ögesini seçin.
3. Uçları aşağıdaki gibi uç taşıyıcılarına yükleyin ve ardından **OK** (Tamam) ögesini seçin.



DİKKAT

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

| Numune Serisi Boyutu | Taşıyıcı Türü | İzleme | Kalem | Alan 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 | Alan 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) seçeneğini belirleyin.
6. Ekstraksiyon Kutusu barkodlarını tarayın.
7. Kullanıcı adını veya reaktifi hazırlayan kişinin baş harflerini girin ve ardından **OK** (Tamam) ögesini seçin.
8. Aksesuar Kutusu 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 | Alan 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 numunelerin üzerine kesilmiş bir plaka kapağı takın (24 numuneli seriler için 4–12. sütunları ve 48 numuneli seriler için 7–12. sütunları).
15. DNA Bağlama plakasını vakum manifolduna barkod sağa bakacak şekilde yükleyin.
16. Bağlama plakasını BVS manifolduna yerleştirmeden önce, olası tıkanıklıklar için kuyuları görsel olarak inceleyin.
Bu, vakum altında reaktiflerin akışına engel oluşturabilir.
17. 24 veya 48 numunelik seriler kullanıyorsanız kullanılmayan kuyuları örtün ve folyo kapakla kapatın. **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 | Alan 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 kuyu haznelere aktarın ve ardından hazneleri aşağıdaki gibi derin kuyu taşıyıcılarına yükleyin.
20. **OK** (Tamam) seçeneğini belirleyin.

| Numune Serisi Boyutu | Taşıyıcı Türü | İzleme | Kalem | Alan 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.



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 ardından DNA bağlama plakasını boş Nihai Plazma derin kuyulu plakasına yerleştirin.
27. DNA Bağlama plakası/Nihai Plazma plakası tertibatını fren açık olarak 5600 × g ile 10 dakika boyunca santrifüjleyin.
28. **OK** (Tamam) seçeneğini belirleyin.

29. DNA Bağlama plakası santrifüjü sırasında vakum temizliğini tamamlayın:
- Vakum manifoldunu çıkarın ve ardından **OK** (Tamam) ögesini seçin.
 - Otomatik atık bertarafının tamamlanmasını bekleyin.
 - Vakum manifoldunu ve vakum sisteminin içini %70 EtOH ile temizleyin ve ardından vakum manifoldunu değiştirin.
 - 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 manifoldu üzerindeki cfDNA Elüsyon plakasının üstüne yerleştirin.
32. DNA Bağlama plakasını barkod sağda olacak şekilde yükleyin ve ardından **OK** (Tamam) ögesini seçin.
33. Otomatik adımlar sırasında ML STAR'ı gözlemleyin.
34. İnkübasyon adımından sonra, **Plates are assembled as indicated** (Plakalar belirtilen şekilde takıldı) onay kutusunu seçin. DNA Bağlama/cfDNA Elüsyon plakası düzeneğinin bir destek tabanı üzerinde olduğunu teyit edin (santrifüj için gerekliyse).
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. Her bir kuyuda uygun hacimler olup olmadığı açısından cfDNA Elüsyon plakasını görsel olarak inceleyin. Beklenen hacim yaklaşık 55 µl'dir.
38. Kapatın ve kitaplık hazırlığı 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) seçeneğini belirleyin.
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:
- Kitaplıkları Hazırlamaya devam etmek için **Yes** (Evet) ögesini seçin.
 - Durdurmak için **Exit** (Çıkış) seçeneğini belirleyin.

GÜVENLİ DURMA NOKTASI

Duruyorsanız cfDNA Elüsyon plakasını kapatın ve -25 °C ila -15 °C'de maksimum 7 gün boyunca saklayın.

Kitaplıkları Hazırlama

Hazırlık

1. Kitlerin son kullanım tarihinin geçmediğini onaylamak için Kitaplık Hazırlama ve Aksesuar kutularını görsel olarak inceleyin.
2. Aşağıdaki reaktifleri hazırlayın. Hazne tüplerini ve derin kuyu haznelerini reaktif adlarıyla etiketleyin.

| Reaktif | Depolama | Talimatlar |
|------------------------------|-------------------|--|
| A-Kuyrukama Karışımı | -25 °C ila -15 °C | Oda sıcaklığında çözünüz. Karıştırmak için vorteksleyin ve ardından kısa süre santrifüjleyin. |
| 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. |
| Uç Onarım Karışımı | -25 °C ila -15 °C | Oda sıcaklığında çözünüz. Karıştırmak için vorteksleyin. |
| Hibridizasyon Tamponu | -25 °C ila -15 °C | Oda sıcaklığında çözünüz. Karıştırmak için vorteksleyin. Kullandıktan sonra tekrar depolayın. |
| Bağlama Karışımı | -25 °C ila -15 °C | Oda sıcaklığında çözünüz. Karıştırmak için vorteksleyin ve ardından kısa süre santrifüjleyin. |
| NIPT DNA Adaptörü Plakası | -25 °C ila -15 °C | Oda sıcaklığında çözünüz. Karıştırmak için vorteksleyin. 1000 x g ile 20 saniye boyunca santrifüjleyin. |
| Yeniden Askıya Alma Tamponu | 2 °C ila 8 °C | Karıştırmak için vorteksleyin. Kullandıktan sonra tekrar depolayın. |
| Numune Safaştırma 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 adaptör plakasını açarken, hatalı sonuçlara yol açabilecek kuyudan kuyuya aerosol çapraz kontaminasyonunu önlemek için çok dikkat edin.

- cfDNA Elüsyon plakası donmuş olarak depolanmışsa aşağıdaki şekilde hazırlayın.
 - Oda sıcaklığında çözündürün.
 - 1 dakika boyunca 1500 rpm'de vorteksleyin.
 - 1000 x g ile 20 saniye boyunca santrifüjleyin.
- Bir yeni tam etekli plakayı Kitaplıklar olarak etiketleyin ve bir plaka barkodu yapıştırın.
- Mutlak EtOH'den %80 EtOH hazırlayın. 40 ml %100 EtOH ve 10 ml DNaz/RNaz içermeyen suyu birleştirin. Karıştırmak için ters yüz edin.
- ML STAR termal kontrolünün açık olduğundan emin olun.

Enzimleri Seyreltme

- 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 |

- 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

- Kitaplık Hazırlamayı başlatmak için **OK** (Tamam) ögesini seçin. **VeriSeq NIPT Method** halihazırda açık değilse:
 - AppLauncher uygulamasını açın ve **VeriSeq NIPT Method** (VeriSeq NIPT Yöntemi) ögesini seçin.
 - Seri Numarasını ve kullanıcı adını girin ve ardından **OK** (Tamam) ögesini seçin.
- Aşağıdaki sarf malzemelerinin Reagent Preparation (Reaktif Hazırlama) ekranında belirtildiği gibi hazırlandığını teyit edin:
 - A-Kuyruklama Karışımı, Bağlama Karışımı ve %80 EtOH.
 - Numune Saflaştırma Boncukları, Uç Onarım Karışımı ve NIPT DNA Adaptörü Plakası.
- Onay kutularını seçin ve ardından **OK** (Tamam) ögesini seçin.
- Kitaplık Hazırlama Kutusu barkodlarını tarayın.
- Kullanıcı adını veya reaktifi hazırlayan kişinin baş harflerini girin ve ardından **OK** (Tamam) ögesini seçin.

6. Aksesuar Kutusu 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 | Alan 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 | Alan 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) seçeneğini belirleyin.
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 | Alan Konumu |
|----------------------|---------------|--------|--|-------------|
| 24, 48, 96 | Multiflex | 19-24 | cfDNA Elüsyon plakası, barkodlu | 1 |
| | | | NIPT DNA Adaptörü plakası, barkodlu | 2 |
| | | | Yeni 96 kuyulu tam etekli plaka, kitaplıklar, barkodlu | 3 |
| | | | Yeni 96 kuyulu tam etekli plakalar | 4, 5 |

12. Derin kuyu taşıyıcısını aşağıdaki gibi yükleyin ve ardından **OK** (Tamam) ögesini seçin.

| Numune Serisi Boyutu | Taşıyıcı Türü | İzleme | Kalem | Alan Konumu |
|----------------------|---------------|--------|--------------------------------------|-------------|
| 24, 48, 96 | Derin kuyulu | 39-44 | Derin kuyu haznesinde 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 | Alan 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 hibritleştirme tamponundan (HT1) kalanı havuzlama için kapta saklayın.
15. Taşıyıcıların, laboratuvar donanımının ve reaktiflerin belirtilen biçimde yüklendiğinden emin olun ve ardından Library Deck Verification (Kitaplık 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) seçeneğini belirleyin.
20. Her bir kuyuda yeterli hacimler olup olmadığı açısından Kitaplıklar plakasını inceleyin.



DİKKAT

Kuyu hacimleri tutarsızsa numuneler hatalı sonuçlar verebilir.

21. Depolayacaksanız Kitaplıklar 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:
 - Kitaplık Miktar Tayini prosedürüne devam etmek için **Yes** (Evet) ögesini seçin.
 - Durdurmak için **Exit** (Çıkış) seçeneğini belirleyin.

GÜVENLİ DURMA NOKTASI

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

Kitaplık Miktar Tayini

Hazırlık

1. Aşağıdaki reaktifleri hazırlayın:

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

2. Kitaplıklar plakası donmuş olarak depolanmışsa aşağıdaki şekilde hazırlayın.
 - a. Plakanın 7 günden fazla depolanmadığını teyit edin ve oda sıcaklığında çözünüz.
 - b. Karıştırmak için vorteksleyin.
 - c. 1000 x g'de 1 dakika boyunca 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 Yöntemi halihazırda açık değilse:
 - a. AppLauncher uygulamasını açın ve **VeriSeq NIPT Method** (VeriSeq NIPT Yöntemi) ögesini seçin.
 - b. Seri Numarasını ve kullanıcı adını girin ve ardından **OK** (Tamam) ögesini seçin.
3. Aksesuar Kutusu 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 | Alan 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. Gerekirse Kitaplıklar 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 | Alan Konumu |
|----------------------|---------------|--------|------------------------------------|-------------|
| 24, 48, 96 | Multiflex | 19-24 | Yeni tam etekli plakalar, barkodlu | 1 |
| | | | Yeni 384 kuyulu plaka, barkodlu | 2 |
| | | | Kitaplıklar plakası, barkodlu | 3 |
| | | | Yeni 96 kuyulu tam etekli plaka | 4, 5 |

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

| Numune Serisi Boyutu | Taşıyıcı Türü | İzleme | Kalem | Alan Konumu |
|----------------------|---------------|--------|-----------------------------|-------------|
| 24, 48, 96 | Tüp | 46 | DNA Miktar Tayini Standardı | 1 |
| | | | DNA Miktar Tayini Reaktif | 2 |

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

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

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

| Numune Serisi Boyutu | Taşıyıcı Türü | İzleme | Kalem | Alan 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) seçeneğini belirleyin.
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) seçeneğini belirleyin.
18. Kitaplıklar plakasını boşaltın.
- Her bir kuyuda yeterli hacimler olup olmadığı açısından plakayı inceleyin.
 - Kitaplıklar plakasını kapatın ve florometrik veri analizi tamamlanana kadar oda sıcaklığında saklayın.
19. Kalan 96 kuyulu plakaları boşaltın ve tutarlı hacimler olup olmadığı açısından her bir kuyuyu 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 temizleyin ve ardından **OK** (Tamam) ögesini seçin.



DİKKAT

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

26. İnkübasyon sonrasında, folyo kapağı açın ve 384 kuyulu plakayı mikroparka okuyucuya yükleyin. Kullanılan cihaz ile uyumluysa Molecular Devices tarafından sağlanan mor adaptör plakasını (Parça Numarası: 0310-4336) veya eşdeğerini kullandığınızdan emin olun.
- Yükleme sırasında A1'in sol üst köşede olduğundan emin olun.
27. SoftMax Pro'da açmak için VeriSeq NIPT şablonunu çift tıklayın.
28. Ana Sayfa sekmesinde **New Experiment** (Yeni Deney) seçeneğini belirleyin.

29. **Read** (Okuma) seçeneğini belirleyin.
30. Verileri XML olarak aşağıdaki gibi dışa aktarın.
 - a. **Plate** (Plaka) seçeneğine sağ tıklayın ve ardından **Rename** (Yeniden Adlandır) seçeneğini belirleyin.
 - 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) seçeneğini belirleyin.
 - 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 ilerleyin 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 [Havuz Kitaplıkları, sayfa 37](#) ilerleyin. Spesifikasyonlar için *VeriSeq NIPT Solution v2 Yazılım 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:
 - [Havuz Kitaplıkları, sayfa 37](#) devam etmek için **Yes** (Evet) ögesini seçin.
 - Durdurmak için **Exit** (Çıkış) seçeneğini belirleyin.

GÜVENLİ DURMA NOKTASI

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

Havuz Kitaplıkları

Hazırlık

1. Aşağıdaki reaktifleri hazırlayın:

| Reaktif | Depolama | Talimatlar |
|--------------------------|-------------------|---|
| Hibridizasyon Tamponu | -25 °C ila -15 °C | Oda sıcaklığında çözdürün. Karıştırmak için vorteksleyin. Kullandıktan sonra tekrar depolayın. |

2. Kitaplıklar plakası donmuş olarak depolanmışsa aşağıdaki şekilde hazırlayın.
 - a. Plakanın 7 günden fazla depolanmadığını teyit edin ve oda sıcaklığında çözdürün.
 - 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. Kitaplıklar plakasını önceden programlanmış termal döngüleyiciye yerleştirin ve denşirme programını çalıştırın.

Yeniden miktar tayini yapmak isteyebileceğiniz için miktar tayini KK metriklerinde başarılı olmadan Kitaplıklar plakasını denşirmeyin.
2. Kitaplıklar plakasını 20 saniye süreyle 1000 x g'de santrifüjleyin.
3. Kitaplıkları havuzlamaya başlamak için **OK** (Tamam) ögesini seçin.
4. VeriSeq NIPT Method açık değilse:
 - a. AppLauncher uygulamasını açın ve **VeriSeq NIPT Method** (VeriSeq NIPT Yöntemi) ögesini seçin.
 - b. Seri Numarasını ve kullanıcı adını girin ve ardından **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 serilerden elde edilenlere benzer küme yoğunlukları sağlamak adına 24 numunelik seriler için havuzlama konsantrasyonları 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) seçeneğini belirleyin.
Numune sayfası oluşturma hakkında bilgi için bkz. *VeriSeq NIPT Solution v2 Yazılım Kılavuzu (belge no 1000000067940)*.
7. Denşirme plakası için zamanlayıcı çalıştırmak üzere **Start** (Başlat) ögesini seçin.
8. Uçları aşağıdaki gibi uç taşıyıcısına yükleyin.

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

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

| Numune Serisi Boyutu | Taşıyıcı Türü | İzleme | Kalem | Alan Konumu |
|----------------------|---------------|--------|---|-------------|
| 24, 48, 96 | Multiflex | 19–24 | Denşirilmiş Kitaplık plakası (barkodlu) | 1 |

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

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

- Her bir uç rafı için ilk ve son ucun konumunu girin ve ardından **OK** (Tamam) seçeneğini belirleyin.
- Taşıyıcıların, laboratuvar donanımının ve reaktiflerin belirtilen biçimde yüklendiğinden emin olun.
- Pooling Deck Verification (Havuzlama Tabla Doğrulama) ekranında **OK** (Tamam) ögesini seçin.
- Otomatik adımlar sırasında ML STAR'ı gözlemleyin.
- Etkilenen kuyular hakkındaki yorumları girin ve ardından **OK** (Tamam) ögesini seçin.
- Workflow Manager tarafından istem verildiğinde ML STAR yükleme tablasında ML STAR'ın taşıyıcıları boşaltması için hiçbir engel bulunmadığından emin olun.
- Tablayı boşaltmak için **Unload** (Boşalt) seçeneğini belirleyin.
- Tüp taşıyıcısı boşaltın.
- Her bir havuzlama tüpünü kapatın, vorteksleyin ve ardından kısa süre santrifüjleyin.
- OK** (Tamam) seçeneğini belirleyin.
- Havuzlamadan sonra kitaplıkları en kısa sürede sekanslayın. Yeniden havuzlamaya olanak sağlamak için Kitaplıklar plakasını kapatın ve -25 °C ila -15 °C'de en fazla 7 gün süreyle depolayın.

GÜVENLİ DURMA NOKTASI

Duruyorsanız, havuzlama tüplerini kapatın ve -25 °C ila -15 °C'de maksimum 7 gün boyunca saklayın.

Sekanslama için Havuzlanan Kitaplıkları 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. |

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

c. Havuz Barkodu

**DİKKAT**

LRM modülüne girilen Havuz Barkodu Workflow Manager'a girilen Havuz Barkodu ile eşleşmelidir. Hatalı çalıştırma yapılandırılmaları analiz yazılımı tarafından reddedilir ve yeniden sekanslama gerektirir.

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

Prosedür

- Aşağıdaki hacimleri reaktif kartuşuna birleştirin ve ardından karıştırmak için pipetleyin.
 - Hibridizasyon Tamponu (900 µl)
 - 450 µl Havuz A (450 µl)
- Yeni nesil bir sekanslama sistemi kullanarak ve aşağıdaki sistem kılavuzunu izleyerek sekanslamaya geçin. yeni nesil sekanslama cihazınızın referans kılavuzu. NextSeq 550Dx için bkz. *NextSeq 550Dx Instrument Referans Kılavuzu (belge no 1000000009513)* veya *NextSeq 550Dx Instrument Kullanım Talimatı (belge no 1000000043133)*.
- Komut geldiğinde doğru çalışma yapılandırmasını teyit edin.
- Gerekirse bu prosedürü Havuz B için tekrar edin.
 - Hedef küme yoğunluğu aralığını elde etmek için kitaplık 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 yeni nesil sekanslama sistemi ile birlikte kullanılabilir:

- 2x36 çift sonlu okuma özelliği.
- VeriSeq NIPT Sample Prep dizin adaptörlerine uyumlu.
- İki kanallı kimya.
- Otomatik 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 ölçümlerinin 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 Yazılım Kılavuzu (belge no 1000000067940)*.

Sonuçların Yorumlanması

VeriSeq NIPT Solution v2 algoritması, sekanslanan çift sonlu kitaplık fragmanlarının birleşiminden elde edilen çeşitli bilgi türlerini bir araya getiren karmaşık bir istatistik modeli kullanır. Bu model, her bir numune kitaplığında olması gerekenden az ya da fazla temsil edilen genom bölgelerini saptamak üzere kullanılır. Önemli bir biçimde bu model, az ya da fazla temsil derecesinin kitaplık için tahmin edilen fetal fraksiyon düzeyinde fetal genomdaki anöploidide olayı ile kantitatif olarak tutarlı 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. İlgili kutu sayıları GC biası için ve daha önce belirlenen bölgeye özel gen kapsamına göre ayarlanır. Bunun gibi normalleştirilmiş kutu sayıları kullanılarak, anöploididen etkilenmiş olabilecek kapsam bölgelerinin otozomların geri kalanıyla karşılaştırılmasıyla her bir otozoma ilişkin istatistiksel puanlar türetilir. Her bir numune için logaritmik olabirlik oranı (LLR), bu kapsam bazlı puanlar 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 hesaplanması fetal fraksiyondaki tahmini belirsizliği de dikkate alır. Sonraki hesaplamalar için oranın doğal logaritması kullanılır. Assay Software, anöploidinin tespit edilmesi için her bir hedef kromozom ve hedef numune için 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 arama 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, kitaplıkta bir Y kromozomunun varlığını ya da yokluğunu raporlama ile sınırlandırılır. İkiz numuneler için cinsiyet kromozomu anöploidisi raporlanamaz.

ANOMALY DETECTED (ANOMALİ SAPTANDI) sonucu numune taramanın seçili tarama türü ve cinsiyet kromozomu raporlama seçeneği ile tutarlı 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 izolasyon amaçlı kullanılmaz.

VeriSeq NIPT Assay Software v2, kromozomal ifade kararları vermek 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 eşliğini 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 ölçümler 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 sekanslama sisteminde veya NextSeq 550Dx sekanslama sisteminde oluşturulmuştur:

| | NextSeq 500/550 | NextSeq 550Dx |
|--------------------|------------------------------|--------------------------------|
| Cihaz | NextSeq Control Software 4.0 | NextSeq Operating Software 1.3 |
| Üzerindeki Yazılım | | |

| | NextSeq 500/550 | NextSeq 550Dx |
|------------------------|--|--|
| 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 kullanılabilir olmuştur. Test analiz seti toplam 2335 numune içermiştir. Bu setten 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 veri için bir başarısızlık

Demografikler ve Gebelik Özellikleri

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

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

Tablo 7 Demografikler 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) | 2.252 (%98) |
| İkinci | 54 (%2) |
| Üçüncü (≥27 hafta) | 1 (%0) |

* Sunulan nihai numuneler 7 ikiz içermiştir.

Klinik Performans

VeriSeq NIPT Solution v2 tarafından karar verilen sonuçlar klinik referans standardı sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır. Tüm çalışma numuneleri, fetal kromozomal anöploidi 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 sonucu için kromozom analizi sonuçları veya NGS bazlı NIPT negatif taramasına sahip bir yenidoğan fizik muayenesi temel alınmıştır. Eğitimli çalışma personeli destekleyicinin Tıbbi Kodlama belgesi uyarınca 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 anöploidileri (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. Tüm yedi ikiz gebelik doğru şekilde T21 olarak saptanmış ve aşağıdaki tabloda raporlanmamıştır.

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

| | 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 tespit edildiği gibi anomaliden etkilenmiş olarak tanımlanmıştır.

Genom Geneli Tarama Performansı

Genom genel tarama için her türlü anomaliye trizomiler, monozomiler ve 7 Mb veya üzeri parsiyel delesyonlar veya duplikasyonlar dahildir. Genom geneli tarama numuneleri, bilinen mosaisizm ile 36 numuneden oluşmuştur. Toplam 2.307 tekil ve ikiz numune test edilmiştir. Yedi ikiz gebeliğin tamamı doğru şekilde 21. kromozom anomalisine sahip olarak saptanmış ve aşağıdaki tablolarda raporlanmamıştır.

Her Anomali için Genom Geneli Tarama Performansı

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

| | 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 Anöplidi için Genom Geneli Tarama Performansı

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

| | 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 7 Mb veya Üzeri Parsiyel Delesyonlar ve Duplikasyonlar için VeriSeq NIPT Solution v2 Duyarlılığı ve Özgüllüğü (Bilinen Mozaikler Dahil)

| | 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 anöplidileri için puanlama yöntemi, temel ve genom geneli taramaların her ikisi için 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 numunedan 36'sı klinik referans standardına göre mosaisizimli olarak tanımlanmıştır. Bu 36 numunedan 23 arama klinik referans standardı ile eşleşmiştir.

Parsiyel Delesyon veya Duplikasyon – 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 metrikleri karşılanırsa raporlanır. Genom geneli taramada, sistem en az 7 Mb'lık parsiyel delesyon ve duplikasyon olayları ve tüm otozomlar genelinde anöploidileri saptar.

Genom geneli tarama kullanılırken, aynı kromozom içindeki hem tam kromozom olayı hem de CNV olayının LLR eşiğini 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 olayının raporlanmasına öncelik verir. Saptanan parsiyel delesyon ve duplikasyon bölgesi kromozom boyutunun %75'inden büyükse ve aynı zamanda tam kromozom için LLT eşiği de aşıyorsa olay tam trizomi veya tüm kromozomun monozomisi olarak raporlanır. Bundan dolayı kromozom boyutunun %75'i veya daha azı 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 [VeriSeq NIPT Solution v2 için Boyuta Göre Ortalama Bölgeler için %95 Saptama Olasılıkları, sayfa 57](#) içinde belirtilen eşik değeri açısından incelenmelidir. Örneğin, eşiği aşan kromozom düzeyi LLR skorlarının tam kromozom anöploidisi ile tutarlı bir yorumlama için daha fazla destek sağladığı bir CNV araması, örnek için bkz. [Tablo 12](#).

Bir 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 tutarlı eşik değerinin üzerinde olmuştur. Parsiyel duplikasyon veya tam trizomi araması için, pozitif NIPT aramasına ilişkin takip yönetimi prenatal tanı ile hasta teyit testini 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 |

| | Klinik Doğru | Genom Geneli Sistem Çıktısı | Anomali Boyutu (Mb) | Kromozom %'si | LLR Skorları |
|----------|------------------|-------------------------------------|---------------------|---------------|--------------|
| 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 Yazılım Kılavuzu (belge no 1000000067940)*.

Cinsiyet Kromozomları

VeriSeq NIPT Solution v2 cinsiyet kromozomu sonuçları klinik referans standardı sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır ve karşılaştırma aşağıdaki tabloda özetlenmektedir. Yüzde uyumu her bir klinik standardı sonucu dahilinde her bir cinsiyet için hesaplanmıştır. Yüzde uyumu, VeriSeq NIPT Solution v2 cinsiyet kromozomu kararının 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 |
| Yüzde Uyumu | | 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 Tahmini Değer ve Negatif Tahmini Değer

Testin pozitif prediktif değeri (PPV) ve negatif prediktif değeri (NPV), test duyarlılığına, özgüllüğüne ve test öncesinde fetüsün trizomiden etkilenmiş olma olasılığına (prevalans) dayanılarak testin klinik kararları bildirme yeteneği 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) adımında 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 |

| Prevalans (%) | PPV (%) | NPV (%) |
|---------------|---------|---------|
| 0,10 | 50,05 | > 99,99 |
| 0,20 | 66,73 | > 99,99 |

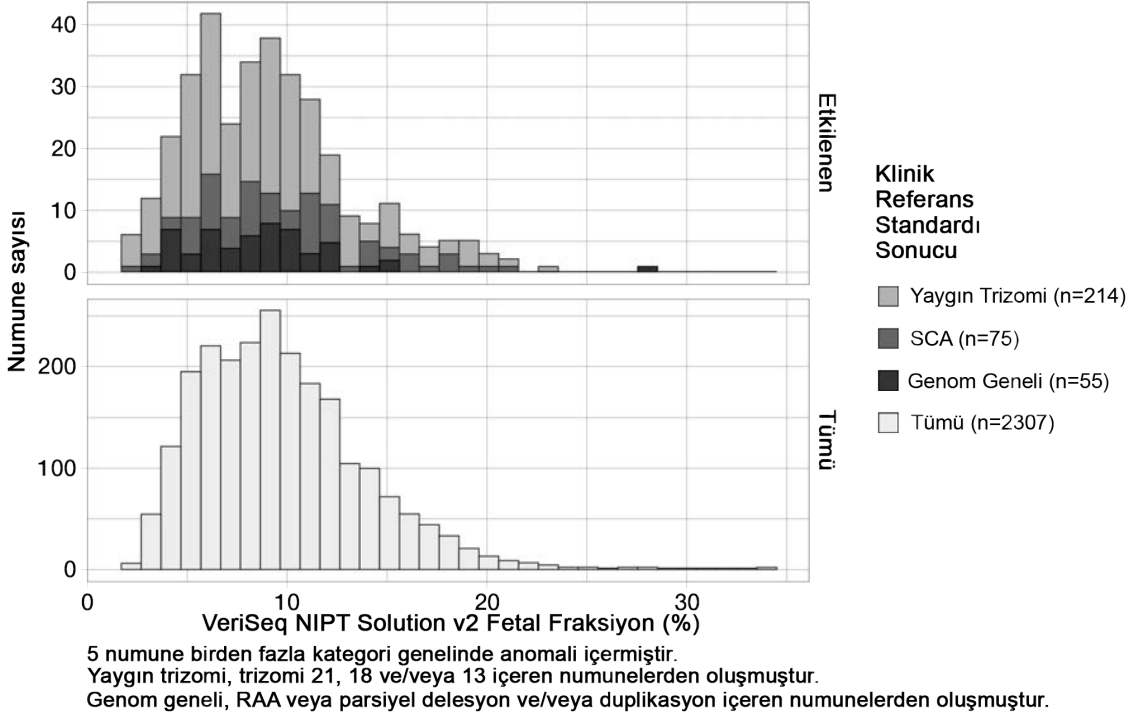
Tablo 17 Genom Geneli Taramada (Bilinen Mozaikler Dahil) Her Türlü Anomali Prevalansı, PPV ve NPV

| 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

Genom geneli taramadan elde edilen VeriSeq NIPT Solution v2 Fetal Fraksiyon (FF) dağıtım tahminleri, Klinik Referans Standardı sonuç kategorisine göre [Şekil 1](#) bölümünde gösterilmektedir.

Şekil 1 Fetal Fraksiyon Dağıtımı



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 Performans Tahmini

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 tutarlı olmuştur. Fetal fraksiyon dağıtımı, yaklaşık 4.500 ikiz numunedan tayin edilmiş ve yaklaşık 120.000 tekil numunedan elde edilen dağıtım ile karşılaştırılmıştır. Anöploidi durumuna koşullu olarak fetal fraksiyon dağıtımı, tekil olduğu farz edilen aramalardan tayin edilmiştir (1.044 adet trizomi 21, 307 adet trizomi 18 ve 192 adet trizomi 13). İki dağıtımın kombinasyonu, ikizlerde anöploidi saptama enterferanslarına 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. Duyarlılık 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 etkilenen 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 edildiğinden, 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'den 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 eşliğinin ne sıklıkla üzerinde olduğu belirlenerek hesaplanmıştır. Buna uygun şekilde özgülük ise, simüle edilen etkilenmemiş ikizler için anöploidi skorlarının, karşılık gelen anöploidi eşliğinin ne sıklıkla altında olduğu belirlenerek hesaplanmıştır (Tablo 18). %95 güven aralıkları, ilgili trizomiye göre etkilenmiş veya etkilenmemiş olarak sınıflandırılan orijinal veri setindeki 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 özgülüğünü 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 edildiğinden, 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 doğru şekilde ne sıklıkla Y kromozomu mevcut olarak sınıflandırıldığı belirlenerek hesaplanmıştır. Özgüllük simüle edilen XX/XX ikizlerinin doğru şekilde ne sıklıkla 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 belirlenmiştir.

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 bölümünde amaçlanan kullanım popülasyonu ile tutarlı 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 gebeliklerinin üçte ikisinin bir etkilenmiş ikizle dizigotik olduğu ve etkilenmiş ikiz gebeliklerinin üçte birinin her ikisi de etkilenmiş ikizlerle monozigotik olduğu varsayılmaktadır.

Tahminler, yalnızca ikiz gebeliklere ilişkin Tablo 18 bölümünde listelenmektedir. Daha da düşük prevalans nedeniyle daha üst sıralardaki 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 üç 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 cihazlar, kitaplık hazırlama kitleri ve sekanslama reaktif lotları arasındaki değişkenliği tahmin etmek olmuştur.

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 fetal fraksiyon T21'den etkilenen numune havuzunun 4 kopyasını ve %10 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 koşulların 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 münhasıran orijinde fetaldir ve dolayısıyla testin saptaması daha kolaydır.

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

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 değeri merkez, operatör, çalıştırma, gün ve kopya nedeniyle değişkenliği 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 değeri sekanslama cihazı, reaktif lotu, operatör, çalıştırma, gün ve kopya nedeniyle değişkenliği içerir.

VeriSeq NIPT Solution v2 sekanslama kesinliğini (toplam standart sapma) karşılaştırmak üzere akış hücresi versiyon 2.0 ile versiyon 2.5'in karşılaştırmalı olarak kullanıldığı ek bir çalışma yapılmıştır. Çalışmaya; tek bir tesiste toplam 48 çalıştırma için kombinasyon başına iki sekanslama çalıştırması, iki 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 fetal fraksiyon T21'den etkilenen numune havuzunun 4 kopyasını ve %10 fetal fraksiyon maternal erkek (XY fetüsü) cfDNA havuzunun 20 kopyasını içermiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçlar [Tablo 21](#) bölümünde sunulmaktadır ve akış hücresi v2.0'a karşı akış hücresi v2.5 kullanıldığında sekanslama kesinliğinde hiçbir fark olmadığını desteklemektedir.

Tablo 21 Akış Hücresi v2.0'a Karşı Akış Hücresi v2.5 Sekanslama Yanıtı Kesinlik 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 değeri sekanslama cihazı, reaktif lotu, çalıştırma, gün ve kopya nedeniyle değişkenliği 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 göstermedi; bu da aynı plaka içerisindeki erkek numunelerden çapraz kontaminasyon olmadığını gösterir. VeriSeq NIPT Solution'da tespit edilebilir çapraz kontaminasyon gözlemlenmemiştir.

Potansiyel Olarak Enterferan Maddeler

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

Albumin, bilirubin, hemoglobin ve trigliseritlerin (endojen) her biri etkilenmeyen kız (XX fetüsü) gebeliklerinden elde edilen maternal plazma havuzlarında birleştirilmiştir. Her bir test maddesi için iki konsantrasyonda test edilmişlerdir (her biri için n=16). Testin gerçekleştirilmesinde hiç bir karışma gözlemlenmedi.

Tablo 22 Potansiyel Olarak Karışan 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 saklanması sonrası ortalama beklenen gDNA konsantrasyonunun üzerinde 1, 2 ve 3 standart sapmaya denk gelir¹²) etkilenmemiş kız (XX fetus)

gebeliklerinden alınan maternal plazmadan ekstrakte edilen cfDNA'ya eklendi. Daha sonra numuneler VeriSeq NIPT Solution ile test edildi (her bir konsantrasyon için n=16). Yüksek gDNA seviyelerinin varlığında test performansında hiç karışma gözlemlenmedi.

Gebelik sırasında sıklıkla kullanılan veya reçete edilen yirmi ilaç tabanlı potansiyel olarak karışan maddeler (eksojen) EP7-A2 (Klinik Kimyada Karışma Testi; Onaylı Kılavuz- İkinci Baskı) uyarınca test edildi. 20 potansiyel enterferan dört havuzda birleştirildi, etkilenmemiş kız (XX fetus) gebeliklerinden alınan maternal plazmaya eklendi ve VeriSeq NIPT Solution ile test edildi (her havuz için N=16). Bu eksojen maddelerin varlığında test performansında hiç karışma gözlemlenmedi.

Tablo 23 Potansiyel Olarak Karışan 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 koşulun %95 saptama olasılığına karşılık gelen fetal fraksiyon düzeyi olarak tanımlanır. Çeşitli ortak koşullar için VeriSeq NIPT Solution v2'nin LOD değerini değerlendirmek amacıyla çalışmalar ve istatistiksel analizler gerçekleştirilmiştir.

VeriSeq NIPT Solution v2 ile işlenen etkilenmiş bir numunedeki ilgilenilen koşulun saptama olasılığı temel olarak üç faktöre bağlıdır:

- fetal fraksiyon
- sekanslama derinliği
- ilgilenilen 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. Aksi şekilde 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.

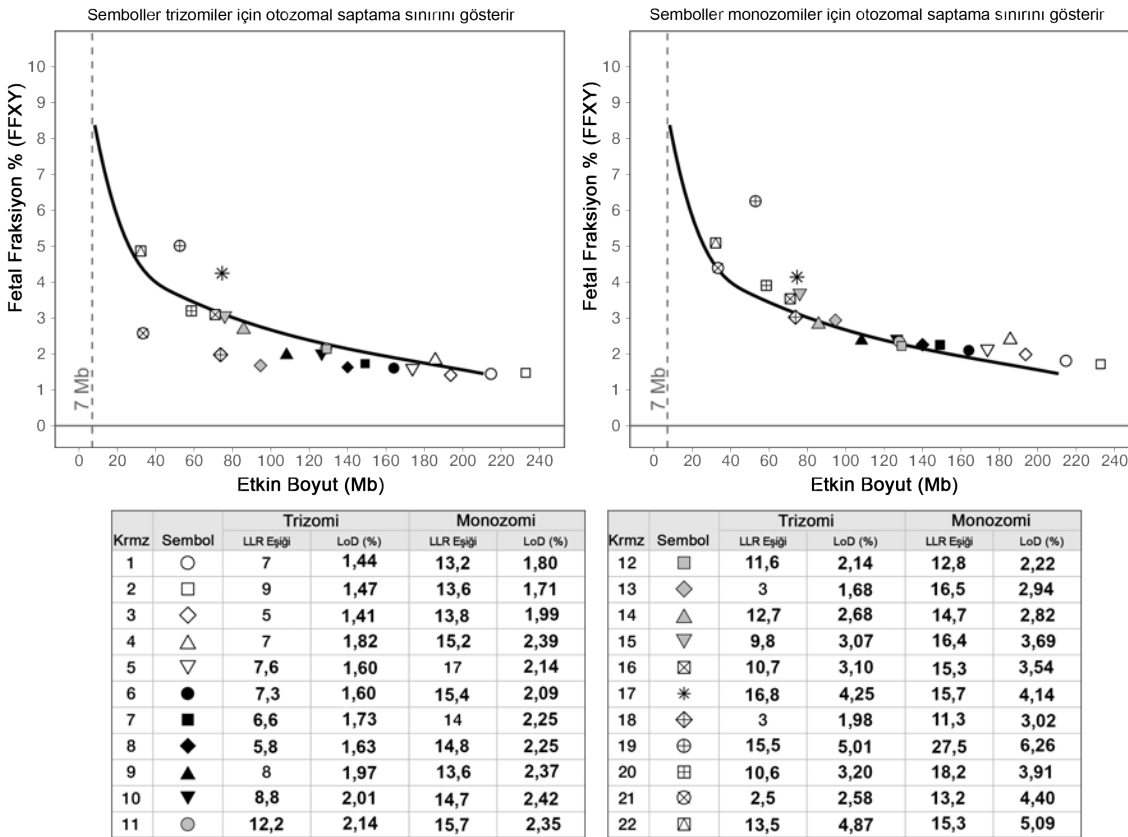
T21 saptaması için LOD değerini belirlemek üzere, havuzlanan T21 numunelerinin ve havuzlanan etkilenmemiş numunelerin karışımlarından oluşan numuneler analiz edilmiştir. İki analit türü, yedili fetal fraksiyon düzeyi seti (%0, %2, %3, %4, %5, %6 ve %10) oluşturacak şekilde bir titrasyon serisi aracılığıyla 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 oluşan bir seti kapsamıştır (%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). T21 için LOD değerini belirlemek üzere sonuç olarak elde edilen veriler üzerinde bir probit analizi gerçekleştirilmiştir.

Bağımsız bir şekilde herhangi bir numunedeki herhangi bir sapmaya ilişkin saptama olasılığını tahmin etmek üzere fetal fraksiyon, sekanslama derinliği ve genom boyutu/karmaşıklığı kullanılarak 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 anöploidilere ve kısmi çıkarma ve çoğaltmalara 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.

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 | Yorumlama | 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 ayrılmıyor | Numuneye santrifüj uygulanmamış. | Santrifüjün başlatıldığından ve tüpün doğru kuvvette döndürüldüğünden emin olun. Numuneyi yeniden alın. | |
| | | Hatalı numune depolama veya taşıma (numunenin hemolizi). | Numuneyi yeniden alın. | Dondurulmuş numuneler ayrılmayacaktır. Hatalı taşıma veya depolama koşulları numunenin hemolizine yol açabilir. |

| Hata Modu | Olası Sonuç | Yorumlama | 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 süte benziyorsa numuneyi iptal edin ve yeniden alınmasını talep edin. Numune normal görünüyorsa numuneyi tekrar test edin. | |
| | 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 taşındığının veya depolandığının göstergesi olabilir. Uygun olmayan numuneleri işlemeden hariç tutun. |
| | Donanım arızası | Ekstraksiyon sırasında materyalin yetersiz parçalanması. | Numuneyi tekrar test edin. Kuyu konumunda diğer numunelerle sorun devam ederse Illumina Teknik Destek ile iletişime geçin. | |

| Hata Modu | Olası Sonuç | Yorumlama | Tavsiye Edilen Eylem | Yorumlar |
|-----------------------------------|--|---|--|--|
| Bağımsız Numune Analizi KK hatası | Sekanslama KK hatası | Olası nedenler aşağıdaki gibidir: <ul style="list-style-type: none">• Yetersiz genetik girdi• Numune kullanımı sırasında hatalı aktarım• Sekanslama reaktifi hatası | Numune Açıklamasını kontrol edin. İlgili plaka konumundaki önceki numunelerin benzer performans gösterip göstermediğini kontrol edin. Numuneyi tekrar 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 oluşturuldu. | Plazmadan yeniden test edin. | |
| Miktar tayini KK hatası | Başarısız miktar tayini çalıştırması. Seri medyanı minimumun altında | Yetersiz işlem verimi. | Miktar tayini işlemini tekrarlayın. Tekrarlanan işlem başarısız olursa Illumina Teknik Destek ile iletişime geçin. | Geçmeyen standart eğrisi metrikleri kitaplık hazırlama ile ilgili sorunları (ör. biyoloji sınıfı olmayan etanol kullanımı) veya miktar tayini işlemi ile ilgili sorunları belirtir. |
| | Başarısız miktar tayini çalıştırması | Standart eğrisi hatası. | Miktar tayini işlemini tekrarlayın. Tekrarlanan işlem başarısız olursa Illumina Teknik Destek ile iletişime geçin. | |
| Havuzlama hatası | 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 içermektedir.) | VeriSeq NIPT Solution v2 tüm veri alanları için yalnızca sayıları, harfleri, alt çizgileri ve kesik çizgileri kabul eder. | Özel karakter içermeyen bir isim kullanarak seriyi yeniden adlandırın. |
| Seri Oluşturma | EM0051 | The Batch ID is greater than 36 characters in length. (Seri Numarasının uzunluğu 36 karakterden fazladır.) | VeriSeq NIPT Solution v2, seri isimlerinin uzunluğunu 36 karakter veya daha azıyla sınırlandırır. | 36 karakterden daha kısa bir isim kullanarak seriyi yeniden adlandırın. |
| Seri Oluşturma | EM0076 | Unable to connect to VeriSeq Onsite Server v2. (VeriSeq Onsite Server v2'ye bağlanamıyor.) | 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 kontrol edin (ping talebi aracılığıyla).4. Vakum atık şişesini kontrol edin. Atık şişesinin yarısından fazlası doluyorsa atık şişesini boşaltın.5. Önceki adımlar sorunu çözmezse Illumina Teknik Destek bölümüyle iletişim kurun. |

| İşlem Adımı | Hata Kodu | Hata İletişimi | Açıklama | Kullanıcı Çözümü |
|-------------------|---------------|--|--|--|
| Seri Oluşturma | EM0118 | This batch has been failed and cannot be further processed. (Bu seri başarısız oldu ve daha fazla işlenemez.) | Belirtilen seri halihazırda başarısız oldu ve daha fazla işlenemez. | VeriSeq Onsite Server v2'deki seri kaydı seçili serinin başarısız olduğunu belirtiyor. Daha fazla işlemeye izin verilmez. Gerekli numunelerle bir başka seri oluşturun. |
| Seri Oluşturma | Geçerli değil | This batch has already completed processing. Would you like to repool? (Bu seri halihazırda işlemeyi tamamladı. Yeniden havuzda toplamak ister misiniz?) | Belirtilen seri havuzlama yoluyla işlenmiş. İzin verilen tek işleme yeniden havuzlamaktır. | Aşağıdaki şekilde yeniden havuzlayın. <ul style="list-style-type: none"> • Re-Pool (Yeniden Havuzla) ögesini seçin. • Yeniden havuzlama öncesinde yöntemi iptal edin ve seri adının doğru olduğundan emin olun. |
| Plazma İzolasyonu | WP0087 | Duplicate sample barcodes loaded. (Tekrarlayan numune barkodları yüklenmiş.) | Aynı barkoda sahip numuneler sisteme yüklenmiş. | <ol style="list-style-type: none"> 1. Hangi numunelerin tekrarladığını tanımlamak için Workflow Manager komutlarını izleyin. 2. Kopyaları çıkarın ve bunları yeniden etiketleyin veya değiştirin. 3. Numuneleri yeniden yükleyin. |

| İşlem Adımı | Hata Kodu | Hata İletişimi | Açıklama | Kullanıcı Çözümü |
|-------------------|---------------|--|--|--|
| Plazma İzolasyonu | EP0102 | Samples specified in the Sample Sheet were not loaded. (Numune Sayfasında belirtilen numuneler yüklenmemiş.) | Numune sayfasında yer alan numuneler yüklenen barkodlara dahil değil. | <ol style="list-style-type: none">1. Eksik numuneleri tanımlamak için Workflow Manager komutlarını izleyin.2. Aşağıdaki seçeneklerden birini uygulayın:<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 yerleşiminin doğru olduğunu teyit etmek için plaka yerleşimini kontrol edin.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 etmez. | <ol style="list-style-type: none"> 1. Vakum hattında bükülme veya diğer 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. Sorun devam ederse, Illumina Teknik Destek bölümüyle iletişim kurun. |
| cfDNA Ekstraksiyonu | WE0153 | Pressure in the vacuum chamber is too high. (Vakum haznesindeki basınç çok yüksek.) | Basınç kontrolü başlamadan önce ölçülen vakum basıncı çok yüksekse sistem arızalanmış olabilir. | Kontrol cihazının arkasındaki tüm vakum bağlantılarının ve hatlarının sağlam olduğundan emin olun. |

| İşlem Adımı | Hata Kodu | Hata İletişimi | Açıklama | Kullanıcı Çözümü |
|---------------------|-----------|--|---|--|
| cfDNA Ekstraksiyonu | WE0996 | Vacuum failed to seal. (Vakum kapatılmadı.) | Devam etmeden önce kapak arızası çözümlenmelidir. | OK (Tamam) ögesini seçmeden önce kapak arızasının çözümlendiğini doğrulayın. 1. Bağlama plakası ile vakum manifoldunun aynı hizada yaslandığından emin olun. Elinizde eldiven varken, kuvvetli bir biçimde bağlama plakasına bastırın. 2. Vakum gürültüsünü dinleyin ve suyun bağlama plakasından akışını gözlemleyin. 3. Workflow Manager'da izleme görünümünü açın. Fiili basınç okuması ortam okumasının en az 50 basınç birimi altına ulaştıktan sonra, cfDNA Ekstraksiyonu işlemine devam etmek için OK (Tamam) ögesini seçin. 4. Gerekli basınç okumasına tahsis edilen sürede ulaşılmazsa ilk lizat yüklemesine ilerlemek için OK (Tamam) ögesini seçin. 5. Lizat bağlama plakasına dağıtıldıktan sonra yöntemi duraklatın. Yeniden yerleştirin ve kuvvetli bir biçimde bağlama plakasına bastırın. 6. Lizat plakadan akamazsa Illumina Teknik Destek bölümüyle iletişime geçin. |

| 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 iptalinden sonra vakum açık kalabilir. | 1. Vakum Kontrol Cihazından vakumu kapatmak için Power (Güç) düğmesine basın. 2. 10 saniye bekleyin ve ardından tekrar Power (Güç) düğmesine basarak vakumu çalıştırın. |
| 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 vb.) karşılaşılmaması halinde sistem plaka taşıma işlemini manuel olarak tamamlaması için kullanıcıyı yönlendirir. | Plakanın kurtarılabilir olduğundan (dökülen malzeme olmadığından) emin olun. <ul style="list-style-type: none">• Plaka kurtarılamıyorsa çalıştırmayı iptal edin.• Plaka kurtarılabiliriyorsa plaka aktarımını manuel olarak tamamlamak için görüntülenen talimatları izleyin. |
| 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 kontrol edin (ping talebi aracılığıyla). |
| | EA0774 | Connection Error. The API server connection failed to validate. (Bağlantı Hatası. API sunucusu bağlantısı doğrulanamadı.) | VeriSeq Onsite Server v2, Workflow Manager'dan gelen 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 kontrol edin (ping talebi aracılığıyla). 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 girdilerin çok uzun olmasını veya kabul edilebilir karakter listesinin ihlalini içerir. |

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

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

Revizyon Geçmişi

| Belge | Tarih | Değişiklik Açıklaması |
|-------------------------------|-----------------|--|
| Belge No 1000000078751 v08 | Ağustos 2022 | İş akışı parça numarasını güncellendi Kitaplık plakası donmuşsa karıştırmak için pipetleme talimatı kaldırıldı. |
| Belge No 1000000078751 v07 | Mayıs 2022 | Prosedür Sınırlamaları VeriSeq NIPT Solution v2 Raporlama başlığına ayrıldı ve ilk iki madde dahil edildi. Kalan metin Testin Sınırlamaları adlı yeni başlığa taşındı. Kaldırıldı <ul style="list-style-type: none">Tüm reaktif etiketlemesinden VeriSeq.Kitaplıkları Hazırlama hazırlığında VeriSeq NIPT Adaptör Plakasına bir plaka barkodu yapıştırın. Eklendi <ul style="list-style-type: none">DNaz/RNaz içermeyen su ifadesine "sertifikalı" sözcüğü.Aşağıdaki mikroparka okuyucularından biri veya eşdeğeri ve SpectraMax M2, M3, M4, M5 ve not.VeriSeq NIPT Microlab STAR bölümüne bir hata işleme olayı esnasında ne yapılacağına açıklaması.Kuyuları görsel olarak incelemek için bir not.Protokol bölümleri boyunca 24 ve 48 numunelik seriler için talimatlar.Mor adaptör plakası veya eşdeğerinin ne zaman kullanılacağına ilişkin adımlar.Demografikler ve Gebelik Özellikleri bölümüne ilk trimestre gebelik sonuçlarını dahil etmek için ifadeler.Derin Kuyu spesifikasyonlarına torca dirençli ifadesini dahil etmek için bir madde. Güncellendi |

| Belge | Tarih | Değişiklik Açıklaması |
|-------------------------------|-----------------|---|
| | | <ul style="list-style-type: none"> • Netlik için benzersiz seri adları konusunda ifadeler ve bir örnek dahil edildi. • Notlar, Dikkat İfadeleri ve Uyarılar için semboller ve biçimlendirme. • Test sonuçları alt maddeleri. • Guanidin tiosiyanat yerine guanidin hidroklorür. • CVS yerine BVS (Temel Vakum Sistemi.) • Genom geneli tarama ve LLR skorunun kullanımı için ifadeler. • Spesifikasyonlar: Reaktif tüpü spesifikasyonları, derin kuyu plakaları, 384 kuyulu plakalar, 96 kuyulu plakalar. |
| Belge No 1000000078751 v06 | Ağustos 2021 | AB Yetkili Temsilcisinin adresi güncellendi. |
| Belge No 1000000078751 v05 | Aralık 2020 | <p>Ruhsatlandırma taleplerini yerine getirmek amacıyla Prosedür İlkeleri, Uyarılar ve Önlemler ve Ürün Etiketleri bölümleri ek açıklamalarla güncellendi.</p> <p>Geçerli Illumina stiline ve organizasyonuna uyum sağlaması amacıyla protokoldeki içerik üzerinde ufak güncellemeler yapıldı. 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 Aksesuar Kutusunda reaktifin DNA Miktar Tayini Standardında yer alan aktif bileşenler güncellendi.</p> <p>Diğer belgelerle tutarlılık sağlanması için Local Run Manager VeriSeq NIPT modülüne ilişkin adlandırma kuralları güncellendi.</p> <p>Revizyon geçmişi eklendi.</p> |
| Belge No 1000000078751 v04 | Ekim 2020 | Ufak düzeltmeler. |
| Belge No 1000000078751 v03 | Eylül 2020 | Malzeme listesi, laboratuvar donanımının spesifikasyonlarını ve bilinen uyumlu seçenekleri belirtmek üzere güncellendi. |

| Belge | Tarih | Değişiklik Açıklaması |
|-------------------------------|-----------------|--|
| Belge No 1000000078751 v02 | Şubat 2020 | Temel ve genom geneli tarama türleri arasındaki farkları daha iyi anlatmak üzere Klinik Performans bilgilerinin sunumu güncellendi. Yeni Temel ve Genom Geneli Taramalar Arasındaki Performans Farkları bölümü eklendi. Prosedür İlkeleri bölümünden tamamlayıcı raporun isteğe bağlılığı konusunda ihtilaf yaratan bilgiler çıkarıldı. Stil tutarlılığının sağlanması için belge genelinde VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 yazılımının adlandırma kuralı güncellendi. Son değişikliklerin yansıtılması için Avustralya ve Illumina Netherlands adreslerinin etiketi güncellendi. |
| 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 KILACAKTIR.

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

© 2022 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

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

CE
2797



Illumina Netherlands B.V.
Steenoven 19
5626 DK Eindhoven
Hollanda

Avustralya Sponsoru

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

Ürün Etiketi

Ürün ambalajı ve etiketinde görülen sembollere dair eksiksiz referans için, support.illumina.com adresinden kitinize yönelik *Documentation* (Belgeler) 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. Temel UDI-DI (0081627002NIPTRP) ile bağlantılıdır.