

Folheto informativo

PARA UTILIZAÇÃO EM DIAGNÓSTICO IN VITRO

Utilização prevista

O VeriSeq™ NIPT Solution v2 é um teste de diagnóstico *in vitro* concebido para realizar o rastreio de deteção de anomalias genómicas fetais genéticas em amostras maternas de sangue periférico total em grávidas com, pelo menos, 10 semanas de gestação. O VeriSeq NIPT Solution v2 utiliza a sequenciação genómica total para detetar duplicações e eliminações parciais em todos os estados de autossomias e aneuploidia em todos os cromossomas. O teste oferece uma opção para reportar uma aneuploidia do cromossoma sexual (sex chromosome aneuploidy, SCA). Este produto não pode ser utilizado como a única base de diagnóstico ou de outras decisões de gestão da gravidez.

O VeriSeq NIPT Solution v2 inclui: o VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 para o VeriSeq NIPT Microlab STAR, o VeriSeq NIPT Sample Prep e o VeriSeq Onsite Server v2 com o VeriSeq NIPT Assay Software v2. O VeriSeq NIPT Solution v2 destina-se a ser utilizado com um sequenciador de nova geração.

Resumo e explicação do ensaio

Anomalias cromossómicas fetais, especificamente aneuploidia, que consiste num número anormal de cromossomas, são uma causa comum de insuficiência reprodutiva, anomalias congénitas, atraso no desenvolvimento e incapacidades intelectuais. A aneuploidia afeta cerca de 1 em 300 nados vivos, com taxas muito superiores associadas a abortos e nados mortos.^{1,2} Até há pouco tempo, existiam dois tipos de exames pré-natais para estas doenças: exames de diagnóstico ou rastreio. Os exames de diagnóstico implicam procedimentos invasivos como a amniocentese ou a biópsia das vilosidades coriónicas. Estes métodos de teste são considerados como o padrão de excelência para a deteção de aneuploidia fetal. No entanto, estão associados a um risco de aborto espontâneo entre 0,11% e 0,22%.³ Os exames convencionais de múltiplos marcadores não representam qualquer risco de aborto espontâneo, uma vez que são exames não invasivos, mas são menos precisos do que os exames de diagnóstico. Os seus índices de deteção de trissomia 21 variam entre 69–96% consoante o exame em particular, a idade materna e a idade gestacional no momento do exame.⁴ Importa referir que apresentam índices de falsos positivos de cerca de 5%, o que pode conduzir a um exame de diagnóstico invasivo para confirmação e, por conseguinte, ao risco de aborto espontâneo relacionado com o procedimento.⁴ Os rastreios por ultrassom também detetam anomalias cromossómicas, mas fazem-no com menos certeza do que estes outros métodos.

Pode detetar a aneuploidia fetal dos cromossomas 21, 18, 13, X e Y com um grau de precisão elevado através de exames pré-natais não invasivos ("noninvasive prenatal testing", NIPT) utilizando a sequenciação de genoma completo de ADN livre (cell-free DNA, cfDNA) obtida a partir do plasma materno às 10 semanas de gestação ou mais tarde. Uma metanálise recente de múltiplos estudos clínicos reportou os índices de deteção ponderados agrupados e as especificidades da trissomia 21 e da trissomia 18 em gestações unifetais da

seguinte forma: trissomia 21 99,7% e 99,96% e trissomia 18 97,9% e 99,96%, respetivamente.⁵ Um estudo sugere que a utilização do NIPT como exame principal em todas as gestações poderia resultar numa redução de 89% no número de procedimentos de confirmação invasivos.⁶

Dada a redução significativa dos índices de falsos positivos com NIPT em comparação com os exames convencionais de múltiplos marcadores, inúmeras organizações médicas profissionais emitiram pareceres a apoiar as várias indicações de utilização do NIPT.

Especificamente, o apoio da International Society for Prenatal Diagnosis (Sociedade Internacional de Diagnóstico Pré-Natal), do American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG) (Colégio Americano de Obstetras e Ginecologistas)/da Society for Maternal Fetal Medicine (SMFM) (Sociedade de Medicina Materno-Fetal), do American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) (Colégio Americano de Genética e Genómica Médica) e da European Society of Human Genetics (Sociedade Europeia de Genética Humana)/American Society of Human Genetics (Sociedade Americana de Genética Humana) que oferecem o NIPT a todas as mulheres grávidas.^{7,8,9} Recomenda-se o aconselhamento pré-teste, o consentimento informado e os exames de diagnóstico para confirmar um resultado positivo de cfDNA.⁴

O VeriSeq NIPT Solution v2 é um teste de diagnóstico in vitro (IVD) não invasivo que utiliza a sequenciação de genoma total de fragmentos de cfDNA derivados de amostras de sangue total periférico materno de grávidas com pelo menos 10 semanas de gestação. O teste oferece duas opções para tipos de rastreio: básico e genoma. O rastreio básico fornece informações sobre o estado de aneuploidia apenas dos cromossomas 21, 18, 13, X e Y. Os rastreios de genoma fornecem duplicações e eliminações parciais de todos os autossomas e estado de aneuploidia de todos os cromossomas. Ambos os tipos de rastreio fornecem a opção de relatório sobre aneuploidia do cromossoma sexual (SCA) com ou sem relatório sobre sexo fetal. A opção de relatório de SCA pode ser desativada. Se a opção de relatório de SCA estiver desativada, o sexo fetal também não será reportado. Para obter mais informações sobre as opções de relatório sobre sexo, consulte o *Guia do Software VeriSeq NIPT Solution v2 (documento n.º 1000000067940)*.

Princípios do procedimento

O VeriSeq NIPT Solution v2 é uma solução automatizada para exames NIPT em laboratório que consiste na preparação automatizada de amostras e na análise de dados de sequenciação. Os VeriSeq NIPT Sample Prep são reagentes especializados de uma única utilização que são utilizados em conjunto com o VeriSeq NIPT Microlab STAR para preparar lotes de 24, 48 ou 96 amostras para sequenciação de nova geração. Os dados de sequenciação de genoma completo de extremidade emparelhada são analisados por um software especializado, o VeriSeq NIPT Assay Software v2, e é gerado um relatório que fornece resultados qualitativos.

O fluxo de trabalho é composto pelos seguintes procedimentos: colheita de amostras, isolamento de plasma, extração de cfDNA, preparação de bibliotecas, quantificação de bibliotecas, pooling de bibliotecas, sequenciação e análise, que são descritos em maior detalhe:

- **Colheita de amostras** — 7–10 ml de sangue total periférico materno são colhidos num tubo de colheita de sangue Cell-free DNA da Streck, que impede a lise celular, a contaminação genómica e estabiliza o sangue total.

- **Isolamento do plasma** — 5 dias após a colheita, o plasma é isolado do sangue total periférico materno utilizando técnicas padrão de centrifugação. O VeriSeq NIPT Microlab STAR aspira e dispensa o plasma para uma placa de 96 poços profundos para processamento subsequente. Na eventualidade de ser necessário testar novamente, as amostras de pós-processamento podem ser novamente tapadas e armazenadas a 4 °C durante mais 5 dias (até um total de 10 dias após a colheita de sangue).

**ATENÇÃO**

Se os tempos acima referidos forem ultrapassados poderá afetar negativamente as taxas de falha da amostra individual.

- **Extração de cfDNA** — A purificação de cfDNA do plasma é alcançada pela absorção para uma placa de ligação, lavando a placa de ligação para remover contaminantes e procedendo à eluição.
- **Preparação de bibliotecas** — Os fragmentos de cfDNA purificados são sujeitos a um processo de reparação das extremidades para converter saliências de 5' e 3' em extremidades cegas. Em seguida, o nucleótido desoxiadenosina é adicionado às extremidades de 3' para criar uma saliência de base única. Os adaptadores indexados que contenham uma saliência de base única de 3' desoxitimidina são então ligados aos fragmentos de cfDNA processados. O ADN ligado é purificado com esferas de imobilização reversível em fase sólida. Cada amostra de um conjunto de 24, 48 ou 96 recebe um adaptador indexado exclusivo. Os adaptadores têm duas finalidades:

**ATENÇÃO**

Tenha o máximo de cuidado para evitar a contaminação cruzada dos índices, o que pode provocar resultados incorretos.

- Os índices permitem a identificação das amostras na sequenciação subsequente.
- Os adaptadores de índice contêm sequências que permitem a captura de biblioteca na superfície sólida de uma célula de fluxo de sequenciação para geração de clusters e sequenciação subsequente.
- **Quantificação** — O produto da biblioteca é quantificado utilizando um corante fluorescente com concentração determinada por comparação a uma curva de ADN padrão.
- **Sequenciação e pool de bibliotecas** — É realizado um pool das bibliotecas da amostra em conjunto em pools de 24 ou 48 amostras em quantidades ajustadas, para minimizar a variação da cobertura. Cada pool é depois sequenciado utilizando um sistema de sequenciação de nova geração.
- O VeriSeq NIPT Solution v2 não inclui equipamento de sequenciação e consumíveis.
- **Análise** — Para cada amostra, a análise é composta pelo seguinte:
 - Identificação de fragmentos de bibliotecas por sequenciação de índices e alinhamento das leituras de extremidade emparelhada a um genoma humano de referência.
 - Estimativa da fração fetal da biblioteca combinando informações da distribuição dos comprimentos e das coordenadas genómicas dos fragmentos das bibliotecas.

- Depois de considerar as tendências conhecidas, um modelo estatístico deteta regiões do genoma que estejam sobre ou sub-representadas na biblioteca de forma consistente com uma anomalia no nível estimado da fração fetal.
- O relatório do NIPT fornece o resumo dos resultados do menu de testes selecionado em que é apresentada uma ANOMALY DETECTED (ANOMALIA DETETADA) ou NO ANOMALY DETECTED (NENHUMA ANOMALIA DETETADA) juntamente com uma estimativa de fração fetal das amostras aprovadas no CQ.
- O relatório complementar fornece métricas quantitativas que caracterizam cada anomalia detetada.

Limitações do procedimento

Limitações do ensaio

- Evidências que suportam a sensibilidade e a especificidade do teste abrangem gestações unifetais e de gémeos. Estas instruções de utilização não fornecem dados de sensibilidade ou especificidade para gestações de trigémeos ou mais.
- O VeriSeq NIPT Solution v2 não se destina a detetar poliploidias, como a triploidia.
- O VeriSeq NIPT Solution v2 não se destina a detetar reorganizações cromossómicas equilibradas.
- O ensaio requer amostras de sangue total periférico materno de mulheres grávidas de, pelo menos, 10 semanas de gestação.
- Nos rastreios básicos, o teste do VeriSeq NIPT Solution v2 procura anomalias cromossómicas específicas. Os resultados reportados como NO ANOMALY DETECTED (NENHUMA ANOMALIA DETETADA) não eliminam a possibilidade de existirem anomalias cromossómicas nos cromossomas testados. Um resultado negativo não elimina a possibilidade de a gestação ter outras anomalias cromossómicas, doenças genéticas ou malformações congénitas (p. ex., tubo neural aberto).
- Nos rastreios genómicos, duplicações ou eliminações substancialmente grandes, que sejam inferiores a 75% do tamanho do cromossoma, podem ser indicativas de uma aneuploidia do cromossoma inteiro.
- Em rastreios genómicos, algumas regiões são excluídas da análise. Está disponível uma lista dessas regiões excluídas no site de Suporte da Illumina. A deteção de uma anomalia genómica só é realizada em regiões não excluídas.
- O relatório de sexo fetal não está disponível em todas as regiões devido aos regulamentos locais que regem a comunicação de género.
- Com base nas evidências na literatura, os resultados de rastreio com base em ADN livre de células podem ser confundidos por determinados fatores maternos e fetais. Alguns destes fatores, entre outros, estão listados abaixo:
 - Transfusão de sangue recente por parte da mãe
 - Transplante de órgãos/células estaminais prévio materno

- Doença autoimune materna
- Neoplasia (benigna e maligna) materna
- Mosaicismo materno
- Variação no número de cópias materna
- Mosaicismo fetoplacentário/confinado à placenta
- Morte fetal/desaparecimento de gémeo

Relatórios do VeriSeq NIPT Solution v2

- O VeriSeq NIPT Solution v2 é um teste de rastreio e não deve ser considerado isoladamente de outras conclusões clínicas e resultados de exames. As conclusões sobre a condição fetal e as decisões de gestão da gravidez não devem ser baseadas unicamente no rastreio do NIPT.⁷
- O VeriSeq NIPT Solution v2 reporta o seguinte:
 - O rastreio básico analisa a sobre-representação dos cromossomas 13, 18 e 21.
 - O rastreio genómico analisa a sobre-representação e a sub-representação de todos os autossomas, incluindo duplicações e eliminações parciais de, pelo menos, 7 Mb.
 - Em gestações unifetais com a opção Yes (Sim) ou SCA selecionada como opção de informação sobre o sexo, as seguintes anomalias do cromossoma sexual: XO, XXX, XXY e XYY.
 - Em gestações unifetais com a opção Yes (Sim) selecionada como opção de informação sobre o sexo, é reportado o sexo fetal.
 - A presença de um cromossoma Y em gestações de gémeos.

Componentes do produto

O VeriSeq NIPT Solution v2 (ref.^a 20030577) é composto pelas seguintes preparações de amostras:

- VeriSeq NIPT Sample Prep (24 samples) (ref.^a 20025895)
- VeriSeq NIPT Sample Prep (48 samples) (ref.^a 15066801)
- VeriSeq NIPT Sample Prep (96 samples) (ref.^a 15066802)

O VeriSeq NIPT Solution v2 (ref.^a 20030577) é composto pelos seguintes componentes de software:

- VeriSeq NIPT Assay Software v2 (ref.^a 20047024), pré-instalado no VeriSeq Onsite Server v2.
 - VeriSeq Onsite Server v2 (ref.^a 20028403 ou 20047000) ou um VeriSeq Onsite Server existente (ref.^a 15076164 ou 20016240) que tenha sido atualizado para a v2.
- VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 (ref.^a 20044988), pré-instalado no VeriSeq NIPT Microlab STAR.
 - VeriSeq NIPT Microlab STAR (ref.^a Hamilton Company Reno: 95475-01 (115 V) e 95475-02 (230 V), Hamilton Company Bonaduz: 806288).
- Local Run Manager VeriSeq NIPT Module (ref.^a 20044989).

Reagentes

Reagentes fornecidos

A Illumina fornece os seguintes reagentes: VeriSeq NIPT Sample Prep (24 samples) (ref.^a 20025895), VeriSeq NIPT Sample Prep (48 samples) (ref.^a 15066801) e VeriSeq NIPT Sample Prep (96 samples) (ref.^a 15066802). Os VeriSeq NIPT Sample Prep estão configurados para serem utilizados com o VeriSeq NIPT Microlab STAR (ML STAR) (ref.^a 95475-01, 95475-02 ou 806288), que é fornecido pela Hamilton Company.

VeriSeq NIPT Sample Prep, Extraction Box

Tabela 1 VeriSeq NIPT Extraction Box (24) e (48), ref.^a 20025869 e 15066803

| Nome do reagente na etiqueta | Número de recipientes no Kit | Substâncias ativas | Armazenamento |
|--|------------------------------|---|---------------|
| Lysis Buffer (Tampão de lise) | 1 | Hipoclorito de guanidina em solução aquosa tamponada | 15 °C a 30 °C |
| Wash Buffer I (Tampão de lavagem I) | 1 | Hipoclorito de guanidina e 2-propanol em solução aquosa tamponada | 15 °C a 30 °C |
| Wash Buffer II (Tampão de lavagem II) | 1 | Solução aquosa tamponada contendo sais | 15 °C a 30 °C |
| Elution Buffer (Tampão de eluição) | 1 | Solução aquosa tamponada | 15 °C a 30 °C |
| Proteinase Buffer (Tampão de proteinase) | 1 | Glicerol em solução aquosa tamponada | 15 °C a 30 °C |
| Proteinase K | 3 | Proteinase K liofilizada | 15 °C a 30 °C |

Tabela 2 VeriSeq NIPT Extraction Box (96), ref.^a 15066807

| Nome do reagente na etiqueta | Número de recipientes no Kit | Substâncias ativas | Armazenamento |
|---------------------------------------|------------------------------|---|---------------|
| Lysis Buffer (Tampão de lise) | 1 | Hipoclorito de guanidina em solução aquosa tamponada | 15 °C a 30 °C |
| Wash Buffer I (Tampão de lavagem I) | 1 | Hipoclorito de guanidina e 2-propanol em solução aquosa tamponada | 15 °C a 30 °C |
| Wash Buffer II (Tampão de lavagem II) | 2 | Solução aquosa tamponada contendo sais | 15 °C a 30 °C |

| Nome do reagente na etiqueta | Número de recipientes no Kit | Substâncias ativas | Armazenamento |
|--|------------------------------|--------------------------------------|---------------|
| Elution Buffer (Tampão de eluição) | 1 | Solução aquosa tamponada | 15 °C a 30 °C |
| Proteinase Buffer (Tampão de proteinase) | 1 | Glicerol em solução aquosa tamponada | 15 °C a 30 °C |
| Proteinase K | 4 | Proteinase K liofilizada | 15 °C a 30 °C |

VeriSeq NIPT Sample Prep, Library Prep Box

Tabela 3 VeriSeq NIPT Library Prep Box VeriSeq NIPT (24) e (48), ref.^a 20026030 e 15066809

| Nome do reagente na etiqueta | Número de recipientes no Kit | Substâncias ativas | Armazenamento |
|---|------------------------------|---|-----------------|
| End Repair Mix (Mistura de reparação de extremidades) | 1 | Polimerase de ADN e dNTPs em solução aquosa tamponada | -25 °C a -15 °C |
| A-Tailing Mix (Mistura de poliadenilação) | 1 | Polimerase de ADN e dATP em solução aquosa tamponada | -25 °C a -15 °C |
| Ligation Mix (Mistura de ligação) | 1 | Ligase de ADN em solução aquosa tamponada | -25 °C a -15 °C |
| Hybridization Buffer (Tampão de hibridização) | 1 | Solução aquosa tamponada | -25 °C a -15 °C |
| NIPT DNA Adapter Plate (Placa adaptadora de ADN NIPT) | 1 | Oligonucleótidos em solução aquosa tamponada | -25 °C a -15 °C |

Tabela 4 VeriSeq NIPT Library Prep Box (96), ref.^a 15066810

| Nome do reagente na etiqueta | Número de recipientes no Kit | Substâncias ativas | Armazenamento |
|---|------------------------------|---|-----------------|
| End Repair Mix (Mistura de reparação de extremidades) | 1 | Polimerase de ADN e dNTPs em solução aquosa tamponada | -25 °C a -15 °C |

| Nome do reagente na etiqueta | Número de recipientes no Kit | Substâncias ativas | Armazenamento |
|---|------------------------------|--|-----------------|
| A-Tailing Mix (Mistura de poliadenilação) | 2 | Polimerase de ADN e dATP em solução aquosa tamponada | -25 °C a -15 °C |
| Ligation Mix (Mistura de ligação) | 2 | Ligase de ADN em solução aquosa tamponada | -25 °C a -15 °C |
| Hybridization Buffer (Tampão de hibridização) | 1 | Solução aquosa tamponada | -25 °C a -15 °C |
| NIPT DNA Adapter Plate (Placa adaptadora de ADN NIPT) | 1 | Oligonucleótidos em solução aquosa tamponada | -25 °C a -15 °C |

VeriSeq NIPT Sample Prep, Accessory Box

Tabela 5 VeriSeq NIPT Accessory Box, ref.^a 15066811

| Nome do reagente na etiqueta | Número de recipientes no Kit | Substâncias ativas | Armazenamento |
|--|------------------------------|---|---------------|
| DNA Binding Plate (Placa de ligação de ADN) | 1 | Microplaca em propileno com membrana em silicone modificada | 2 °C a 8 °C |
| Resuspension Buffer (Tampão de ressuspensão) | 1 | Solução aquosa tamponada | 2 °C a 8 °C |
| Sample Purification Beads (Esferas de purificação de amostras) | 1 | Esferas paramagnéticas de fase sólida em solução aquosa tamponada | 2 °C a 8 °C |
| DNA Quantification Reagent (Reagente de quantificação de ADN) | 1 | Corante intercalante de ADN em DMSO | 2 °C a 8 °C |
| DNA Quantification Standard (Padrão de quantificação de ADN) | 1 | Padrão dsDNA, ADN não específico e azida de sódio em solução aquosa tamponada | 2 °C a 8 °C |

VeriSeq NIPT Sample Prep, Workflow Tubes and Labels

Tabela 6 Workflow Tubes and Labels, ref.ª 15071543

| Nome do item na etiqueta | Número de itens no Kit | Armazenamento |
|--|------------------------|---------------|
| Label (LBL)–Plate Barcode (Etiqueta (LBL) – Código de barras da placa) | 9 | 15 °C a 30 °C |
| Label (LBL)–Deep-well Plate Barcode (Etiqueta (LBL) – Código de barras de poços profundos) | 12 | 15 °C a 30 °C |
| Tube (TB)–Empty Pooling Tube (Tubo (TB) – Tubo de pooling vazio) | 5 | 15 °C a 30 °C |

Reagentes não fornecidos

Reagentes necessários, mas não fornecidos

- Reagentes de sequenciação e consumíveis necessários para o sistema de sequenciação de nova geração (NGS)
- Água sem RNase/DNase certificada
- Etanol a 100% (prova 200) para biologia molecular

NOTA O etanol de grau biológico não molecular pode afetar negativamente o desempenho do ensaio.

Reagentes opcionais, não fornecidos

- Soro fisiológico fosfato-tamponado da Dulbecco (DPBS) para controlo sem modelo (NTC)

Armazenamento e manuseamento

1. A temperatura ambiente é definida entre 15 °C e 30 °C.
2. Todos os reagentes destinam-se a uma única utilização. Após a preparação dos reagentes para utilização, deve utilizá-los imediatamente.
3. Se qualquer parte da embalagem ou do conteúdo dos componentes do VeriSeq NIPT Solution estiver danificada ou comprometida, contacte o Apoio ao Cliente da Illumina.
4. Os reagentes mantêm-se estáveis até à data de validade especificada nas etiquetas dos kits quando armazenados conforme indicado. Para as condições de armazenamento, consulte a coluna Armazenamento nas tabelas de [Reagentes na página 6](#). Não utilize reagentes cuja data de validade expirou.

5. As alterações ao aspeto físico dos reagentes fornecidos pode indicar a deterioração dos materiais. Se ocorrerem alterações no aspeto físico (p. ex., alterações óbvias na cor ou turvação evidente do reagente podem indicar contaminação microbiana), não utilize os reagentes.
6. Adira às melhores práticas que se seguem quando manusear esferas de purificação de amostras:
 - Nunca congele as esferas.
 - Permita que as esferas atinjam a temperatura ambiente antes de utilizar.
 - Imediatamente antes de utilizar, agite as esferas em vórtice até à suspensão ideal e a cor parecer homogénea.
7. O tampão de lise, o tampão de lavagem I, o tampão de lavagem II, o tampão de eluição e o tampão de proteinase podem formar precipitados ou cristais visíveis. Antes de utilizar, agite em vórtice vigorosamente e, em seguida, inspecione visualmente para garantir que não estão presentes precipitados.
8. Nunca congele o sangue total após a colheita.
9. Proceda à sequenciação das bibliotecas assim que possível após o pooling. As bibliotecas de pool mantêm -se estáveis até um máximo de 7 dias entre -25 °C e -15 °C. Não é necessária qualquer desnaturação adicional se forem armazenadas durante este período de tempo e nestas condições.

Equipamento e materiais

Equipamento e materiais necessários, não fornecidos

Equipamento necessário, não fornecido

| Equipamento | Fabricante |
|--|--|
| Sistema de sequenciação de nova geração (NGS) com as seguintes capacidades: <ul style="list-style-type: none"> • Sequenciação de extremidades emparelhadas 2 x 36 bp • Compatível com os adaptadores de índice duplo do VeriSeq NIPT Sample Prep • Produção automática de ficheiros BCL • Química de dois canais • 400 milhões de leituras de extremidades emparelhadas por ensaio • Compatível com o VeriSeq NIPT Assay Software v2 ou com um NextSeq 550Dx Sequencing System | Fornecedor de instrumentos ou Illumina, ref. ^a 20005715 |
| Congelador, -25 °C a -15 °C | Fornecedor geral do laboratório |

| Equipamento | Fabricante |
|---|---|
| Microcentrífuga | Fornecedor geral do laboratório |
| Pipette aid | Fornecedor geral do laboratório |
| Frigorífico, 2 °C a 8 °C | Fornecedor geral do laboratório |
| Pipetas de canal único de 20 µl | Fornecedor geral do laboratório |
| Pipetas de canal único de 200 µl | Fornecedor geral do laboratório |
| Pipetas de canal único de 1000 µl | Fornecedor geral do laboratório |
| Gerador de vórtice | Fornecedor geral do laboratório |
| Centrífuga e conjunto de rotor para tubos de colheita de sangue | |
| Equivalente: | Fornecedor geral do laboratório |
| <ul style="list-style-type: none"> • Centrífuga refrigerada com capacidade de 1600 × g com opção “sem travão” • Rotor de cesto móvel com reservatórios • Inserções do cesto, capacidade para 24, 48 ou 96 tubos, 76 mm de profundidade mínima • Adaptadores de inserção para suportar os tubos de colheita de sangue de 16 x 100 mm | Beckman Coulter, artigo n.º 392304 (120 V ou 230 V) |
| Recomendado: | |
| <ul style="list-style-type: none"> • Allegra X12R Series Centrifuge, 1600 g | Beckman Coulter, artigo N.º 369704 |
| <ul style="list-style-type: none"> • Allegra Centrifuge GH-3.8, Rotor com reservatórios | Beckman Coulter, artigo N.º 392805 |
| <ul style="list-style-type: none"> • Allegra Centrifuge Bucket Covers, conjunto de dois | Beckman Coulter, artigo N.º 359150 |
| <ul style="list-style-type: none"> • Allegra Centrifuge Adapter Assembly, 16 mm, conjunto de quatro | |
| Conjunto de centrífuga e rotor para microplacas | |

| Equipamento | Fabricante |
|--|--|
| <p>Equivalente:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Capacidade de centrifugação de 5600 × g • Rotor de placa oscilante com suportes de placa de 96 poços, profundidade mínima de 76,5 mm. • Multifuge X4 Pro-MD 120V TX-1000BT • Sorvall Legend XTR Centrifuge <ul style="list-style-type: none"> • HIGHPlate 6000 Microplate Rotor • Rotor high plate 6000 <p>Base de suporte para microplacas</p> <ul style="list-style-type: none"> • Recomendado: <ul style="list-style-type: none"> • Base de suporte MicroAmp de 96 poços • Suporte de placas PCR de 96 poços | <p>Fornecedor geral do laboratório</p> <p>Thermo Scientific VWR, catálogo n.º 76326-254</p> <p>Thermo Fisher Scientific, catálogo n.º 75004521 (120 V) ou catálogo n.º 75004520 (230 V)</p> <p>Thermo Fisher Scientific, catálogo n.º 75003606</p> <p>Thermo Scientific VWR, catálogo n.º 97040-244</p> <p>Thermo Fisher Scientific, catálogo n.º 4379590</p> <p>Thermo Fisher Scientific, catálogo n.º AB-0563/1000</p> |
| <p>Um dos seguintes leitores de microplacas ou equivalente (fluorómetro) com o SoftMax Pro v6.2.2 ou superior:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Gemini XPS • SpectraMax M2, M3, M4 e M5 <ul style="list-style-type: none"> • A inserção roxa está incluída no leitor de microplacas para utilização no fluxo de trabalho | <p>Dispositivos moleculares, peça n.º XPS</p> <p>Dispositivos moleculares, peça n.º M2, M3, M4 e M5</p> |
| <p>SpectraMax High-Speed USB, Adaptador de série</p> | <p>Dispositivos moleculares, peça n.º 9000-0938</p> |
| <p>Termociclador com as seguintes especificações:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Tampa aquecida • Intervalo de temperatura entre 4 °C e 98 °C • ±2 °C de precisão de temperatura • 2 °C por segundo de taxa de aumento mínima • Compatível com placa Twin.tec PCR de 96 poços, saia completa | <p>Fornecedor geral do laboratório</p> |
| <p>VeriSeq NIPT Microlab STAR</p> | <p>Hamilton, peça n.º 95475-01 (115 V), peça n.º 95475-02 (230 V) ou peça n.º 806288 (para Hamilton Company Bonaduz)</p> |

| Equipamento | Fabricante |
|---|--|
| VeriSeq Onsite Server v2 ou um VeriSeq Onsite Server atualizado | Illumina, ref. ^a 20028403 ou 20047000 (v2) ou n.º 15076164 ou n.º 20016240 (atualizado) |
| Se utilizar um NextSeq 550Dx Sequencing System: | Illumina, ref. ^a 20028870 |
| <ul style="list-style-type: none"> NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5, 75 cycles | |

Equipamento opcional, Não fornecido

| Equipamento | Fabricante |
|---|--|
| Sistema de descapsulação Pluggo | LGP Consulting, peça n.º 4600 4450 |
| Placa de validação por fluorescência SpectraMax SpectraTest FL1 | Dispositivos moleculares, peça n.º 0200-5060 |
| Rotador/revólver de tubos, tubos de 15 ml, 40 rpm, 100–240 V | Thermo Scientific, catálogo n.º 88881001 (EUA) ou catálogo n.º 88881002 (UE) |

Materiais necessários, não fornecidos

| Consumível | Fabricante |
|--|---|
| Pontas de filtro condutoras não esterilizadas de 1000 µl | Hamilton, ref. ^a 235905 |
| Pontas de filtro condutoras não esterilizadas de 300 µl | Hamilton, ref. ^a 235903 |
| Pontas de filtro condutoras não esterilizadas de 50 µl | Hamilton, ref. ^a 235948 |
| Reservatório de poços profundos com as seguintes especificações: | Fornecedor geral do laboratório |
| <ul style="list-style-type: none"> Formato de microplaca SLAS 1–2004 com 96 poços com fundo em pirâmide ou cónico e uma capacidade mínima de 240 ml. Polipropileno com preferência para baixa ligação de ADN para todas as superfícies de contacto com a amostra. As dimensões internas (nível de líquido) são compatíveis com os passos automatizados de aspiração e dispensação do VeriSeq NIPT Microlab STAR. As dimensões referentes à altura são compatíveis com os movimentos automatizados do VeriSeq NIPT Microlab STAR. | Reservatórios compatíveis: <ul style="list-style-type: none"> Corning Axygen, ref.^a RES-SW96-HP-SI Agilent, produto n.º 201246-100 |

| Consumível | Fabricante |
|---|---|
| <p>Tubo de reagente com as seguintes especificações:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Tubo que se encaixa em segurança, sem forçar, no suporte do VeriSeq NIPT Microlab STAR com um fundo cónico e uma capacidade mínima de 20 ml. • Polipropileno isento de RNase/DNase. • As dimensões internas do reservatório (nível de líquido) dão origem a níveis de líquido utilizando volumes de reagentes de ensaio que são compatíveis com os passos automatizados de aspiração e dispensação do VeriSeq NIPT Microlab STAR. • As dimensões referentes à altura são compatíveis com os movimentos automatizados do VeriSeq NIPT Microlab STAR. | <p>Fornecedor geral do laboratório</p> <p>Tubos compatíveis:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Roche, ref.ª 03004058001 |
| <p>Placas de poços profundos com as seguintes especificações:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Formato de microplaca SLAS 1–2004, 3–2004 e 4–2004 com 96 poços com fundo em pirâmide ou cónico e uma capacidade mínima do poço de 2 ml. • Polipropileno transparente com preferência para material com baixa ligação de ADN para todas as superfícies de contacto com a amostra. • As dimensões do poço dão origem a níveis de líquido que são compatíveis com os passos automatizados de aspiração e dispensação do VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Saia de placa que possibilita a colocação de códigos de barras nas placas na posição necessária, com adesão à superfície segura e plana. • Estrutura resistente a torção capaz de suster, no mínimo, 5600 x g. • As dimensões referentes à altura da placa são compatíveis com os movimentos automatizados do VeriSeq NIPT Microlab STAR | <p>Fornecedor geral do laboratório</p> <p>Placas compatíveis:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Eppendorf, ref.ª 0030505301 • Eppendorf, ref.ª 30502302 • USA Scientific, ref.ª 1896–2000 |

| Consumível | Fabricante |
|---|---|
| <p>Placas de 384 poços com as seguintes especificações:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Microplaca com 384 poços, otimizada para volumes reduzidos, com uma capacidade mínima do poço de 50 µl. • Polistireno preto opaco com bloqueio de luz e baixa ligação de ADN para todas as superfícies de contacto com a amostra. • As dimensões do poço dão origem a níveis de líquido que são compatíveis com os passos automatizados de aspiração e dispensação do VeriSeq NIPT Microlab STAR. • As dimensões referentes à altura da placa são compatíveis com os movimentos automatizados do VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Saia de placa que possibilita a colocação de códigos de barras nas placas na posição necessária, com adesão à superfície segura e plana. | <p>Fornecedor geral do laboratório</p> <p>Placas compatíveis:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Corning, n.º de produto 3820 |
| <p>Placas de 96 poços com as seguintes especificações:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Microplaca com uma estrutura resistente a torção capaz de suster, no mínimo, 5600 x g e 96 poços transparentes com fundos cônicos, bordas elevadas e uma capacidade mínima do poço de 150 µl. • Polipropileno isento de RNase/DNase com baixa ligação de ADN para todas as superfícies de contacto com a amostra. • As dimensões do poço dão origem a níveis de líquido que são compatíveis com os passos automatizados de aspiração e dispensação do VeriSeq NIPT Microlab STAR. • As dimensões referentes à altura da placa são compatíveis com os movimentos automatizados do VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Saia de placa que possibilita a colocação de códigos de barras nas placas na posição necessária, com adesão à superfície segura e plana. • Compatível com termocicladores para desnaturação. | <p>Fornecedor geral do laboratório</p> <p>Placas compatíveis:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Eppendorf, ref.^a 0030129512 • Eppendorf, ref.^a 30129580 • Eppendorf, ref.^a 30129598 • Eppendorf, ref.^a 30129660 • Eppendorf, ref.^a 30129679 • Bio-Rad, ref.^a HSP9601 |
| <p>Um dos seguintes selos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Micro-selo "F" alumínio • Selos de alumínio | <p>Bio-Rad, n.º de catálogo MSF1001 Beckman Coulter, artigo n.º 538619</p> |
| <p>Cell-Free DNA BCT CE</p> | <p>Streck, catálogo n.º 218997</p> |
| <p>Tampas de pressão</p> | <p>Sarstedt, pedido n.º 65.802</p> |

| Consumível | Fabricante |
|---|---------------------------------|
| Tubos de tampa de enroscar de 2 ml | Fornecedor geral do laboratório |
| Pontas de filtro de 20 µl para pipetador de 20 µl | Fornecedor geral do laboratório |
| Pontas de filtro de 200 µl para pipetador de 200 µl | Fornecedor geral do laboratório |
| Pontas de filtro de 1000 µl para pipetador de 1000 µl | Fornecedor geral do laboratório |
| Equivalente: | Fornecedor geral do laboratório |
| <ul style="list-style-type: none"> Um desinfetante rápido em spray à base de álcool Uma solução com detergente desinfetante | |
| Recomendado: | |
| <ul style="list-style-type: none"> Água desionizada e etanol a 70% | |

Materiais opcionais, não fornecidos

| Consumível | Fabricante |
|--|---------------------------------|
| Soro fisiológico fosfato-tamporado da Dulbecco (DPBS) para controlo sem modelo (NTC) | Fornecedor geral do laboratório |
| Tubo, tampa de enroscar, 10 ml (apenas para amostras de controlo) | Sarstedt, pedido n.º 60.551 |
| Tubo, tampa de enroscar, 50 ml | Fornecedor geral do laboratório |
| Pipetas serológicas de 25 ml | Fornecedor geral do laboratório |
| Pipetas serológicas de 10 ml | Fornecedor geral do laboratório |

Colheita, transporte e armazenamento de espécimes



ATENÇÃO

Manuseie todos os espécimes como se fossem agentes potencialmente infecciosos.

- As amostras de sangue total de 7–10 ml têm de ser colhidas num Cell-Free DNA BCT da Streck.
- O transporte de sangue total tem de cumprir todas as normas regulamentadoras aplicáveis para o transporte de agentes etiológicos. São recomendados métodos de expedição/transporte.
- Durante o transporte, armazene a temperaturas entre 4 °C e 30 °C. Após a receção das amostras, armazene entre 2 °C e 8 °C até estar pronto a continuar. O tempo entre a colheita de sangue e o isolamento inicial do plasma não deve ultrapassar os 5 dias.

- Na eventualidade de ser necessário testar novamente, as amostras de pós-processamento podem ser novamente tapadas e armazenadas a 4 °C durante mais 5 dias (até um total de 10 dias após a colheita de sangue).



ATENÇÃO

Se os tempos acima referidos forem ultrapassados poderá afetar negativamente as taxas de falha da amostra individual.

Avisos e precauções

- Este ensaio contém proteinase K. Podem ocorrer lesões pessoais por inalação, ingestão, contacto da pele e contacto ocular. Utilize numa área bem ventilada, use roupa de proteção, evite respirar o pó e elimine quaisquer recipientes e conteúdos não utilizados de acordo com as normas de segurança governamentais aplicáveis.
- Este ensaio contém cloreto de guanidínio. Podem ocorrer lesões pessoais por inalação, ingestão, contacto da pele e contacto ocular. Utilize numa área bem ventilada, use roupa de proteção e elimine quaisquer recipientes e conteúdos não utilizados de acordo com as normas de segurança governamentais e locais aplicáveis.
- Este ensaio contém 2-propanol, um químico inflamável. Mantenha afastado do calor e chama descoberta. Podem ocorrer lesões pessoais por inalação, ingestão, contacto da pele e contacto ocular. Utilize numa área bem ventilada, use roupa de proteção e elimine quaisquer recipientes e conteúdos não utilizados de acordo com as normas de segurança governamentais e locais aplicáveis.
- Este ensaio contém dimetil sulfóxido, um líquido corrosivo e combustível. Podem ocorrer lesões pessoais por inalação, ingestão, contacto da pele e contacto ocular. Utilize numa área bem ventilada, use roupa de proteção e elimine quaisquer recipientes e conteúdos não utilizados de acordo com as normas de segurança governamentais e locais aplicáveis.
- Para impedir a formação de gases perigosos, não elimine resíduos de extração de cfDNA (contém hipoclorito de guanidina) juntamente com resíduos que contenham lixívia (hipoclorito de sódio).
- Manuseie todas as amostras como se contivessem agentes potencialmente infecciosos.
- Aplique as precauções de rotina do laboratório. Não coloque a pipeta na boca. Não coma, beba ou fume nas áreas designadas para trabalho. Use luvas descartáveis e batas de laboratório quando manusear amostras e reagentes de ensaio. Lave bem as mãos depois de manusear amostras e reagentes de ensaio.
- Não utilize componentes de ensaio após a data de validade indicada na etiqueta da respetiva caixa. Não troque componentes de ensaio de lotes diferentes. Os lotes de ensaio estão identificados na etiqueta da respetiva caixa. Armazene os componentes de ensaio à temperatura especificada.
- Para evitar a degradação da amostra ou do reagente, certifique-se de que todos os vapores de hipoclorito de sódio da limpeza estão totalmente dissipados antes de iniciar o protocolo.

- O não seguimento dos procedimentos da forma descrita pode resultar em resultados erróneos ou na redução significativa da qualidade das amostras.
- Comunique imediatamente quaisquer incidentes graves relacionados com este produto à Illumina e às Autoridades competentes dos Estados-membros nos quais o utilizador e o paciente estão estabelecidos.
- Para obter informações ambientais, de segurança e de saúde, consulte as fichas de dados de segurança (FDS) em support.illumina.com/sds.html.

Notas processuais

Evitar a contaminação

- Utilize pontas e consumíveis de laboratório novos.
- Utilize pontas resistentes a aerossóis para reduzir o risco de contaminação cruzada e contaminação cruzada entre amostras.
- Devido ao potencial de contaminação, tenha o máximo de cuidado para garantir que o conteúdo dos poços permanece no devido lugar. Não derrame o conteúdo. Centrifugue após qualquer passo de agitação por vórtice.
- Siga as normas regulamentadoras aplicáveis sobre práticas de laboratório e higiene adequadas quando manusear sangue e derivados do sangue.
- Não utilize sprays aerossóis com lixívia quando estiver a preparar uma biblioteca. A contaminação com vestígios de lixívia pode conduzir à falha do ensaio.
- Ao remover o selo de qualquer placa, coloque a placa numa superfície firme e plana, segurando-a com firmeza. Remova lentamente o selo, garantindo que este não entra em contacto com poços expostos. Tenha o cuidado de não tocar em poços expostos nem perturbar o conteúdo. A contaminação cruzada entre poços pode dar origem a resultados incorretos.

Limpeza da plataforma do VeriSeq NIPT Microlab STAR

- Antes de utilizar, verifique se a plataforma se encontra limpa. Pelo menos uma vez por semana, realize uma manutenção semanal e siga estas instruções de limpeza.
- Remova todos os suportes descarregáveis e limpe com um desinfetante rápido em spray à base de álcool (água desionizada e etanol a 70%) e deixe secar. Se estiverem demasiado sujos, mergulhe-os depois numa solução com detergente desinfetante, enxague com desinfetante à base de álcool e deixe secar.
- Abra a tampa frontal e limpe a plataforma com um pano saturado com água desionizada e etanol a 70%. Em particular, tem de verificar se os blocos deslizantes estão limpos.

- Remova o tubo do sistema de vácuo básico (Basic Vacuum System, BVS) e limpe o tubo, as juntas e os compartimentos internos do BVS com um pano. Evite limpar as juntas com etanol, pois pode ser abrasivo para o material.
- Esvazie o recipiente de resíduos de pontas da cabeça CORE de 96 pipetas e do canal independente.
- Remova a placa de ejeção de pontas do canal independente da estação de resíduos de pontas e limpe-a: pulverize água desionizada e etanol a 70% diretamente na superfície e limpe. Coloque um novo saco de plástico sobre a estrutura e volte a fixá-la. Volte a colocar a placa de ejeção de pontas limpa no lugar.
- Pulverize água desionizada e etanol a 70% diretamente na superfície e na calha da caixa de resíduos da cabeça CORE de 96 pipetas e limpe bem.
 - Se for difícil remover a sujidade dos resíduos das pontas, limpe com um pano molhado com água sem RNase/DNase até remover a sujidade. Elimine o pano devidamente. Esterilize com desinfetante à base de álcool.
- Humedeça um pano sem pelos ou uma compressa de algodão com etanol a 70%. Passe a compressa na janela do scanner de laser do leitor de códigos de barras. Utilize o mesmo pano ou compressa para limpar cada poço do adaptador de placas do CPAC. Se utilizar um pano, pressione o pano em cada poço do adaptador com a parte de trás de uma caneta para assegurar que o interior do poço fica bem limpo.
- Limpe os canais independentes:
 - Nos canais independentes, limpe a manga de ejeção da ponta (parte exterior dos canais de pipetagem) com um pano que não largue fiapos embebido em água desionizada e etanol a 70%. (Consulte o Guia de referência do *Hamilton Microlab STAR N.º 15070074*.)
 - Limpe o disco de paragem e os o-rings da cabeça de pipetagem (peça exterior dos canais de pipetagem) com um pano que não largue fiapos embebido em água desionizada e etanol a 70%.
- Limpe a cabeça CORE de 96 pipetas:
 - Utilize o mesmo pano que não largue fiapos embebido em água desionizada e etanol a 70% para limpar a estrutura da cabeça CORE de 96 pipetas e a parte de baixo dos discos de paragem.
 - Utilize o mesmo pano ou uma tira de pano embebida em água desionizada e etanol a 70% para limpar entre as partes laterais dos canais de pipetagem da cabeça CORE de 96 pipetas para limpar os o-rings. Repita este procedimento para cada canal de pipetagem na cabeça CORE de 96 pipetas.
- Pulverize água desionizada e etanol a 70% na parte frontal e lateral da tampa e seque.
- Limpe a faixa de proteção de carregamento automático com um pano embebido em água desionizada e etanol a 70% e esfregue sem exercer pressão.
- Quando a plataforma e os componentes estiverem completamente secos, substitua os suportes.

NOTA Uma manutenção e uma limpeza incorretas do ML STAR podem resultar em contaminação cruzada e num desempenho fraco do ensaio.

Controlo de qualidade

Pode avaliar o material de controlo com características conhecidas de desempenho para detetar diferenças no processamento e nos procedimentos técnicos no laboratório.

A execução de uma amostra de controlo ou controlo sem modelo reduz o número total de amostras maternas desconhecidas que é possível processar com cada preparação de amostras.

Não ultrapasse duas amostras NTC por lote de 24 ou 48 amostras ou quatro amostras NTC por lote de 96 amostras.

Instruções de utilização

Sugestões e técnicas

A menos que seja especificado um ponto de paragem de segurança no protocolo, avance imediatamente para o passo seguinte.

Colocar códigos de barras nas placas

- Os códigos de barras para placas de saia completa começam por PL.
- Os códigos de barras para placas de poços profundos começam por DW.
- Aplique os códigos de barras nas placas de saia completa e nas placas de poços profundos na lateral, junto à coluna 12.
- Coloque as placas com o código de barras voltado para a direita para permitir a leitura automática.

Colocar e retirar selos da placa

- Tenha o máximo de cuidado para evitar a contaminação cruzada: não deve haver qualquer líquido visível na parte de baixo do selo.
 - Certifique-se de que a parte de baixo exposta do selo não entra em contacto com os poços expostos.
 - Tenha o cuidado de não tocar em poços expostos.
- Coloque sempre o selo na placa de 96 poços antes dos seguintes passos do protocolo:
 - Passos de centrifugação.
 - Passos do termociclador.
- Para selar a placa, aplique o selo de alumínio na placa e pressione. Certifique-se de que pressiona toda a placa e de que o selo está justo em cada poço individual.
- Antes de retirar o selo da placa, faça o seguinte:
 - Centrifugue brevemente a placa de 96 poços a 1000 × g durante 20 segundos.
 - Coloque a placa numa superfície plana e remova lentamente o selo.

VeriSeq NIPT Microlab STAR

- Antes de utilizar, efetue e documente a manutenção necessária de acordo com as instruções do fabricante.
- Observe o ML STAR durante os passos automáticos. Monitorize a interface do software VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 para verificar solicitações e instruções para o operador.
- Mantenha a cobertura frontal colocada durante o funcionamento.
- Mantenha a plataforma desimpedida durante a operação.
- Se lhe for apresentado como opção o botão **Exclude** (Excluir) durante um evento de resolução de erro, não selecione esta opção em qualquer circunstância. Se não for possível continuar o método após o evento de resolução de erro ou tiver opções limitadas de resolução de erro, interrompa o ensaio.
- Durante os passos de vácuo de placas, se solicitado pelo VeriSeq NIPT Workflow Manager v2, ajude manualmente a formar o selo entre a placa e o tubo de vácuo.
- Permita ao sistema eliminar as pontas do adaptador automaticamente. Não remova manualmente as pontas a menos que seja solicitado pelo software.
- Remova os reagentes gastos e os consumíveis utilizados conforme solicitado pelo Workflow Manager (Gestor de fluxo de trabalho).
- Esvazie o garrafão de resíduos de vácuo diariamente. O primeiro garrafão nunca deve exceder 1/2 da capacidade. O excesso de resíduos de vácuo pode danificar a bomba de vácuo e reduzir o vácuo aplicado do sistema.
- Para lotes de 24, 48 e 96 amostras, carregue uma rack completa de pontas de 8 canais contadas individualmente antes de começar o método.

Processar amostras

Procedimento

1. Execute os seguintes passos para cada alíquota:
 - a. Centrifugue amostras com código de barras a 1600 × g durante 10 minutos, a 4 °C e com o travão desligado.
 - b. Remova os tubos da amostra quando a centrífuga parar totalmente.
Inicie o isolamento do plasma no prazo de 15 minutos após a centrifugação. Se passarem mais de 15 minutos, centrifugue novamente.
2. Inspeccione cada tubo quanto à adequação da amostra, verificando os seguintes requisitos:
 - O volume da amostra é o previsto.
 - Há uma separação clara entre as camadas de eritrócitos e de plasma das amostras, visíveis após a centrifugação.
 - O nível de plasma encontra-se, pelo menos 1,5 ml acima da camada leuco-plaquetária.
 - A amostra não está demasiado hemolisada (ou seja, o plasma não é vermelho escuro).

- A amostra não está lipémica (isto é, o plasma não está branco turvo ou com um aspeto leitoso opaco).
- A amostra não está coagulada.



ATENÇÃO

As amostras que tenham sido armazenadas ou manuseadas incorretamente podem deixar de ser adequadas. Se forem processadas amostras inadequadas ao longo do fluxo de trabalho, estas podem coagular a placa de ligação durante as extrações, fazendo com que as amostras extravasem para os poços adjacentes.

3. Destape os tubos e volte a colocá-los nos suportes dos tubos. Coloque todas as amostras e quaisquer controlos de plasma para o lote.



ATENÇÃO

Durante um evento de resolução de erro, se a opção Exclui (Excluir) lhe for apresentada, não a seleccione. Se não for possível continuar o método após o evento de resolução de erro e tiver opções limitadas de resolução de erro, interrompa o ensaio.

Isolar plasma

Preparação

1. Coloque 1 etiqueta de placa de poços profundos de plasma intermédio e aplique um código de barras.
2. Coloque 1 etiqueta de placa de poços profundos de plasma final e aplique um código de barras.
3. Para lotes de 24, 48 e 96 amostras, carregue uma rack completa de pontas de 8 canais contadas individualmente antes de começar o método.



ATENÇÃO

Certifique-se de que utiliza o tipo de placa correto para as placas de Plasma intermédio e Plasma final. Utilizar um reservatório de poços profundos em vez de uma placa de poços profundos provoca a junção das amostras e pode causar resultados incorretos.

Procedimento

1. Abra o AppLauncher e, em seguida, seleccione **VeriSeq NIPT Method** (Método VeriSeq NIPT).
2. Introduza o ID do lote exclusivo e o nome de utilizador e, em seguida, seleccione **OK**.
O ID do lote pode conter ≤ 26 caracteres. Pode utilizar números, letras, sublinhados (_) ou hífenes (-).
Por exemplo: 2025-10-16_Lote3.
O ID do lote não é sensível a maiúsculas e minúsculas. Os ID do lote sensíveis a maiúsculas e minúsculas não são considerados exclusivos.

Os nomes dos lotes têm de ser exclusivos e não devem ter como única diferença as maiúsculas e minúsculas. Por exemplo, os nomes de lote Lote01 e lote01 não são exclusivos. A mesma regra aplica-se aos ID de amostra.

3. Selecione **New Batch** (Novo lote).
4. Depois de iniciar, selecione **OK** para iniciar o isolamento do plasma.
5. Execute um dos seguintes passos:
 - Para carregar uma ficha de amostras existente, selecione a ficha de amostras associada ao lote e, em seguida, selecione **OK**.
 - Para avançar sem selecionar uma ficha de amostras, selecione **No Sample Sheet** (Sem ficha de amostras).

Para mais informações sobre a criação de uma ficha de amostras, veja o *Guia do Software VeriSeq NIPT Solution v2 (documento n.º 1000000067940)*.

NOTA O tipo de amostra, singleton (unifetal) ou twins (gémeos), tem de ser registado com precisão para cada amostra para garantir uma análise correta dos dados. Se selecionar **No Sample Sheet** (Sem ficha de amostras), certifique-se de que predefine os valores da amostra nas Workflow Manager Service Tools (Ferramentas de serviço do Gestor de fluxo de trabalho). Consulte o *Guia do Software VeriSeq NIPT Solution v2 (documento n.º 1000000067940)* para obter mais informações.

6. Selecione o tamanho do lote e, em seguida, selecione **OK**.
7. Selecione o número de controlos sem modelo (NTC) e, em seguida, selecione **OK**.

Os campos de NTC são sempre os últimos campos selecionados. Por exemplo, no caso de dois NTC num ensaio de 24 amostras, as posições 23 e 24 são NTC.
8. Confirme que todos os códigos de barras estão afixados e, em seguida, coloque as amostras, as pontas e as placas (com o código de barras voltado para a direita) no suporte.

9. Seleccione **OK** depois de cada pedido de confirmação de carregamento.

| Tamanho do lote de amostras | Suporte Tipo | Pista | Item | Posição do local |
|-----------------------------|--------------|-------|--|------------------|
| 24, 48, 96 | Ponta | 7–12 | Pontas de 1000 µl | 5 |
| | | | Pontas de 1000 µl (apenas lotes de 96 amostras) | 4, 5 |
| | Tubo | 15 | Tubos de amostra de sangue preparado 1–24 (para todos os tamanhos de lote) | 1–24 |
| | Tubo | 16 | Tubos de amostra de sangue preparado 25–48 (apenas para o tamanho de lote com 48 e 96 amostras) | 25–48 |
| | Tubo | 17 | Tubos de amostra de sangue preparado 49–72 (apenas para o tamanho de lote com 96 amostras) | 49–72 |
| | Tubo | 18 | Tubos de amostra de sangue preparado 73–96 (apenas para o tamanho de lote com 96 amostras) | 73–96 |
| | Multiflex | 19–24 | Placa de poços profundos vazia, Plasma final – Com código de barras | 4 |
| | Multiflex | 19–24 | Placa de poços profundos vazia, Plasma intermédio – Com código de barras | 5 |
| | Reagente | 47 | Soro fisiológico fosfato-tamponado da Dulbecco (DPBS) – utilizado para controlo sem modelo (NTC) (Opcional) | 5 |

10. Certifique-se de que os suportes, o material do laboratório e os reagentes são carregados corretamente.
11. No ecrã Pre-Spin Deck Verification (Verificação da plataforma de pré-rotação), seleccione **OK**.
12. Observe o ML STAR a executar os passos automáticos.
13. Quando solicitado pelo Workflow Manager (Gestor de fluxo de trabalho), certifique-se de que a plataforma de carregamento do ML STAR está livre de obstruções para permitir que o ML STAR descarregue os suportes.
14. Seleccione **Unload** (Descarregar) para descarregar a plataforma.
15. Remova a placa de poços profundos de plasma intermédio conforme indicado em seguida.
 - a. Inspeccione a placa para verificar se os volumes são consistentes em cada poço (sem erros de pipetagem). O volume esperado é de 1000 µl.
 - b. Registe quaisquer inconsistências quando o procedimento de isolamento do plasma estiver concluído.
 - c. Coloque o selo na placa, carregue de forma equilibrada e centrifugue a 5600 × g durante 10 minutos com o travão desligado ou na definição mais baixa.

16. Selecione **Yes** (Sim) para avançar para a Preparação final do plasma.
17. Remova o selo da placa e volte a colocar no suporte.

| Tamanho do lote de amostras | Suporte Tipo | Pista | Item | Posição do local |
|-----------------------------|--------------|-------|---|------------------|
| 24, 48, 96 | Multiflex | 19–24 | Placa de poços profundos de plasma intermédio | 5 |

18. Selecione a caixa de verificação **Intermediate Plasma plate has been spun** (A placa de plasma intermédio foi rodada) e, em seguida, selecione **OK**.
19. Observe o ML STAR a executar os passos automáticos.
20. Quando solicitado pelo Workflow Manager (Gestor de fluxo de trabalho), certifique-se de que a plataforma de carregamento do ML STAR está livre de obstruções para permitir que o ML STAR descarregue os suportes.
21. Selecione **Unload** (Descarregar) para descarregar a plataforma.
22. Quando solicitado pelo Workflow Manager (Gestor de fluxo de trabalho), esvazie os suportes e a plataforma.
23. Remova a placa de poços profundos de Plasma final.
24. Inspeccione a placa para verificar os seguintes erros:
 - Volumes inconsistentes em cada poço. O volume esperado é de 900 µl.
 - Sedimentos celulares visíveis.
 - Hemólise excessiva.

Se observar sedimentos celulares anormais ou hemólise excessiva, invalide a amostra afetada no fim do método de isolamento do plasma ou utilize o Batch Manager (Gestor de lotes). Para mais informações sobre o Batch Manager (Gestor de lotes), consulte o *Guia do Software VeriSeq NIPT Solution v2 (documento n.º 1000000067940)*.
25. Quando solicitado pelo Workflow Manager (Gestor de fluxo de trabalho), selecione **OK**.
26. Introduza comentários sobre os poços afetados e, em seguida, selecione **OK**.
27. Execute um dos passos que se seguem.
 - Para prosseguir para a extração de cfDNA, selecione **Yes** (Sim).
 - Para parar, selecione **Exit** (Sair).

PONTO DE PARAGEM DE SEGURANÇA

Se parar, coloque o selo na placa de plasma final e armazene a uma temperatura entre 2 °C e 8 °C até um máximo de 7 dias.

Extração de cfDNA

Preparação

1. Examine visualmente as caixas de extração e de acessórios para confirmar se a data de validade do kit não expirou.
2. Prepare os seguintes reagentes. Coloque uma etiqueta nos tubos do reservatório e nos reservatórios de poços profundos com o nome dos reagentes.

| Reagente | Armazenamento | Instruções |
|--|---------------|---|
| Placa de poços profundos de plasma final | 2 °C a 8 °C | Se anteriormente armazenado, deixe repousar durante 30 minutos para alcançar a temperatura ambiente. Centrifugue a 1000 x g durante 20 segundos. Retire o selo da placa de poços profundos de plasma final antes de utilizar. |

3. Adicione lentamente 3,75 ml de tampão de proteinase a cada frasco de reagente de proteinase K.
 - Prepare 3 frascos para 24 e 48 amostras.
 - Prepare 4 frascos para 96 amostras.
4. Tape os frascos de proteinase K e agite em vórtice até à ressuspensão.



ATENÇÃO

Não contamine a tampa de borracha. O contacto da tampa de borracha com outras substâncias irá contaminar amostras futuras.

5. Proceda ao pool da proteinase K preparada de todos os frascos para um tubo de reagente e marque-o como proteinase K.
6. Adicione 100 ml de EtOH a 100% a cada frasco de reagente de tampão de lavagem II.
 - Prepare 1 frasco para 24 e 48 amostras.
 - Prepare 2 frascos para 96 amostras.
7. Inverta os frascos de tampão de lavagem II para misturar.
8. Assinale as caixas de verificação nos frascos de tampão de lavagem II.
9. Coloque 1 etiqueta de nova placa de saia completa intermédia e aplique um código de barras de placa.
10. Coloque 1 etiqueta de nova placa de saia completa de eluição de cfDNA e aplique um código de barras de placa.
11. Coloque 1 etiqueta de nova placa de poços profundos de extração intermédia e aplique um código de barras de placa de poços profundos.
12. Aplique um código de barras de placa na placa de ligação de ADN.

13. Aplique um selo de alumínio nos poços não utilizados nos lotes de 24 e 48 amostras.
14. Prepare uma solução de limpeza de EtOH a 70% (EtOH a 70%, água sem DNase/RNase a 30%) para limpar o sistema de vácuo.
15. Prepare o sistema conforme indicado em seguida.
 - a. Remova o tubo de vácuo e limpe com EtOH a 70%.
Evite limpar as juntas com EtOH, pois pode ser abrasivo para o material.
 - b. Esvazie os garrafões de resíduos de vácuo.
 - c. Certifique-se de que o sistema de vácuo do ML STAR está ligado.

Procedimento

1. Selecione **OK** para iniciar a extração de cfDNA.
2. Se o **VeriSeq NIPT Method** (Método VeriSeq NIPT) não estiver aberto:
 - a. Abra o AppLauncher e, em seguida, selecione **VeriSeq NIPT Method** (Método VeriSeq NIPT).
 - b. Introduza o ID do lote e o nome de utilizador e, em seguida, selecione **OK**.
3. Coloque as pontas nos suportes das pontas da forma que se segue e, em seguida, selecione **OK**.



ATENÇÃO

Antes de começar o método para lotes de 24, 48 e 96 amostras, adicione uma rack cheia de pontas de 8 canais.

| Tamanho do lote de amostras | Suporte Tipo | Pista | Item | Posição do local |
|-----------------------------|--------------|-------|-------------------|------------------|
| 24 | Ponta | 1–6 | Pontas de 1000 µl | 1 |
| | | 7–12 | Pontas de 300 µl | 1 |
| 48 | Ponta | 1–6 | Pontas de 1000 µl | 1; 2 |
| | | 7–12 | Pontas de 300 µl | 1 |
| 96 | Ponta | 1–6 | Pontas de 1000 µl | 1, 2, 3, 4 |
| | | 7–12 | Pontas de 300 µl | 1 |

4. Coloque as pontas contadas nos suportes de pontas da forma que se segue.

| Tamanho do lote de amostras | Suporte Tipo | Pista | Item | Posição do local |
|-----------------------------|--------------|-------|-------------------|------------------|
| 24, 48, 96 | Ponta | 49–54 | Pontas de 1000 µl | 1 |
| | | | Pontas de 300 µl | 2 |
| | | | Pontas de 50 µl | 3 |

5. Introduza a localização da primeira e da última ponta de cada rack de pontas e, em seguida, selecione **OK**.

6. Leia os códigos de barras da caixa de extração.
7. Introduza o nome de utilizador ou as iniciais do preparador do reagente e, em seguida, selecione **OK**.
8. Leia os códigos de barras da caixa de acessórios.
9. Introduza o nome de utilizador ou as iniciais do preparador do reagente e, em seguida, selecione **OK**.
10. Confirme se os códigos de barras estão afixados.
11. Retire o selo da placa de poços profundos de plasma final, se necessário.
12. Coloque as placas (com o código de barras voltado para a direita) no suporte de placas da forma que se segue e, em seguida, selecione **OK**.

| Tamanho do lote de amostras | Suporte Tipo | Pista | Item | Posição do local |
|-----------------------------|--------------|-------|--|------------------|
| 24, 48, 96 | Multiflex | 19–24 | Nova placa de saia completa, intermédia, com código de barras | 1 |
| | | | Nova placa de saia completa, eluição de cfDNA, com código de barras | 2 |
| | | | Nova placa de poços profundos, extração intermédia, com código de barras | 4 |
| | | | Placa de poços profundos de plasma final, com código de barras | 5 |

13. Confirme se a placa de ligação de ADN tem código de barras e, em seguida, selecione **OK**.
14. Em lotes de placas parciais, coloque um selo recortado nos poços sem selo (colunas 4–12 para lotes de 24 amostras e colunas 7–12 para lotes de 48 amostras).
15. Coloque a placa de ligação de ADN no tubo de vácuo com o código de barras voltado para o lado direito.
16. Antes de colocar a placa de ligação no tubo BVS, faça a inspeção visual dos poços para identificar quaisquer obstruções possíveis.
Tal pode impedir o fluxo de reagentes em vácuo.
17. Se estiver a utilizar lotes de 24 ou 48 amostras, cubra os poços não utilizados e sele os mesmos com selo de alumínio. Selecione a caixa de verificação **Are DNA Binding Plate Columns Sealed?** (As colunas da placa de ligação de ADN encontram-se seladas?) e, em seguida, selecione **OK**.
18. Coloque os tubos de reagente no suporte de reagentes da forma que se segue e, em seguida, selecione **OK**.

| Tamanho do lote de amostras | Suporte Tipo | Pista | Item | Posição do local |
|-----------------------------|--------------|-------|----------------------------|------------------|
| 24, 48 | Reagente | 47 | 16 ml de tampão de eluição | 1 |
| | | | 11 ml de proteinase K | 2 |
| 96 | Reagente | 47 | 16 ml de tampão de eluição | 1 |
| | | | 15 ml de proteinase K | 2 |

19. Transfira os reagentes especificados para os reservatórios dos poços profundos e, em seguida, coloque os reservatórios nos suportes de poços profundos da seguinte forma.
20. Selecione **OK**.

| Tamanho do lote de amostras | Suporte Tipo | Pista | Item | Posição do local |
|-----------------------------|---------------|-----------|--------------------------------|------------------|
| 24, 48 | Poço profundo | 39– 44 | 125 ml de tampão de lavagem II | 1 |
| | | | 125 ml de tampão de lavagem I | 2 |
| | | | 60 ml de EtOH a 100% | 3 |
| | | | 100 ml de tampão de lise | 4 |
| | | | 60 ml de água sem RNase/DNase | 5 |
| 96 | Poço profundo | 39– 44 | 200 ml de tampão de lavagem II | 1 |
| | | | 125 ml de tampão de lavagem I | 2 |
| | | | 100 ml de EtOH a 100% | 3 |
| | | | 100 ml de tampão de lise | 4 |
| | | | 100 ml de água sem RNase/DNase | 5 |

21. Aguarde pela conclusão da verificação automática do volume de reagente.
22. Confirme se o frasco de resíduos de vácuo está vazio (recomenda-se que esteja a metade da sua capacidade) e, em seguida, selecione **OK**.
23. Confirme a colocação de todos os suportes, do material do laboratório e dos reagentes e, em seguida, selecione **OK** no ecrã Extraction Deck Verification (Verificação da plataforma de extração).
24. Observe o ML STAR durante os passos automáticos.
-  Tem de invalidar manualmente os excessos de amostra não detetados pelo sistema antes da contaminação dos poços circundantes.
25. Após o passo de vácuo final, remova a placa de ligação de ADN e limpe a superfície inferior com EtOH a 70%.
26. Coloque o selo em quaisquer poços destapados da placa de ligação de ADN e, em seguida, coloque a placa de ligação de ADN na placa vazia de poços profundos de plasma final.
27. Centrifugue o conjunto da placa de ligação de ADN/placa de plasma final a 5600 ×g durante 10 minutos com o travão ligado.
28. Selecione **OK**.
29. Durante a centrifugação da placa de ligação de ADN, proceda à limpeza a vácuo:
- Remova o tubo de vácuo e, em seguida, selecione **OK**.
 - Aguarde pela conclusão da eliminação dos resíduos.

- c. Limpe o tubo de vácuo e o interior do sistema de vácuo com EtOH a 70% e, em seguida, volte a colocar o tubo de vácuo.
 - d. Selecione a caixa de verificação **Manifold is on Vacuum** (O tubo está em vácuo) para iniciar a transferência da placa de eluição no tubo de vácuo e, em seguida, selecione **OK**.
30. Após a centrifugação, retire os selos dos poços que contêm as amostras da placa de ligação de ADN.
 31. Coloque a placa de ligação de ADN por cima da placa de eluição de cfDNA que está no tubo de vácuo.
 32. Coloque a placa de ligação de ADN com o código de barras voltado para a direita e, em seguida, selecione **OK**.
 33. Observe o ML STAR durante os passos automáticos.
 34. Após o passo de incubação, selecione a caixa de verificação **Plates are assembled as indicated** (As placas estão montadas conforme indicado). Confirme que o conjunto da placa de ligação de ADN/placa de eluição de cfDNA está numa base de suporte (se necessário por centrifuga).
 35. Sele os poços abertos na placa de ligação de ADN.
 36. Centrifugue a 5600 × g durante 2 minutos com o travão ativado e, em seguida, selecione **OK**.
 37. Inspeção visualmente a placa de eluição de cfDNA para verificar se os volumes são consistentes em cada poço.
O volume esperado é de cerca de 55 µl.
 38. Coloque o selo e preserve a placa de eluição de cfDNA para a preparação da biblioteca.
 39. Quando solicitado pelo Workflow Manager (Gestor de fluxo de trabalho), certifique-se de que a plataforma de carregamento do ML STAR está livre de obstruções para permitir que o ML STAR descarregue os suportes.
 40. Selecione **Unload** (Descarregar) para descarregar a plataforma.
 41. Retire todos os suportes e limpe a plataforma do ML STAR e, em seguida, selecione **OK**.
 42. Introduza comentários sobre os poços afetados e, em seguida, selecione **OK**.
 43. Execute um dos seguintes passos:
 - Para continuar a Preparar bibliotecas, selecione **Yes** (Sim).
 - Para parar, selecione **Exit** (Sair).

PONTO DE PARAGEM DE SEGURANÇA

Se parar, coloque o selo na placa de eluição de cfDNA e armazene entre -25 °C e -15 °C até um máximo de 7 dias.

Preparar bibliotecas

Preparação

1. Examine visualmente as caixas de preparação de bibliotecas e de acessórios para confirmar se a data de validade dos kits não expirou.

2. Prepare os seguintes reagentes. Coloque uma etiqueta nos tubos do reservatório e nos reservatórios de poços profundos com os nomes dos reagentes.

| Reagente | Armazenamento | Instruções |
|--|-----------------|--|
| A-Tailing Mix (Mistura de poliadenilação) | -25 °C a -15 °C | Descongele à temperatura ambiente. Agite por vórtice para misturar e, em seguida, centrifugue brevemente. |
| Placa de eluição de cfDNA | -25 °C a -15 °C | Se previamente armazenada, confirme se a placa não está armazenada há mais de 7 dias e descongele à temperatura ambiente. Agite por vórtice a 1500 rpm durante 1 minuto. Centrifugue a 1000 × g durante 20 segundos. |
| End Repair Mix (Mistura de reparação de extremidades) | -25 °C a -15 °C | Descongele à temperatura ambiente. Agite por vórtice para misturar. |
| Hybridization Buffer (Tampão de hibridização) | -25 °C a -15 °C | Descongele à temperatura ambiente. Agite por vórtice para misturar. Volte a armazenar após a utilização. |
| Ligation Mix (Mistura de ligação) | -25 °C a -15 °C | Descongele à temperatura ambiente. Agite por vórtice para misturar e, em seguida, centrifugue brevemente. |
| NIPT DNA Adapter Plate (Placa adaptadora de ADN NIPT) | -25 °C a -15 °C | Descongele à temperatura ambiente. Agite por vórtice para misturar. Centrifugue a 1000 × g durante 20 segundos. |
| Resuspension Buffer (Tampão de ressuspensão) | 2 °C a 8 °C | Agite por vórtice para misturar. Volte a armazenar após a utilização. |
| Sample Purification Beads (Esferas de purificação de amostras) | 2 °C a 8 °C | Deixe repousar durante 30 minutos para alcançar a temperatura ambiente. Agite em vórtice vigorosamente antes de cada utilização. Misture por vórtice ou inversão até que todas as esferas estejam em suspensão e a mistura seja homogénea. |



ATENÇÃO

Ao retirar o selo da NIPT DNA Adapter Plate (Placa adaptadora de ADN NIPT) tenha o máximo cuidado para evitar contaminação cruzada por aerossóis entre poços, o que pode produzir resultados incorretos.

3. Se a placa de eluição de cfDNA foi armazenada congelada, prepare a mesma conforme indicado em seguida.
 - a. Descongele à temperatura ambiente.
 - b. Agite por vórtice a 1500 rpm durante 1 minuto.
 - c. Centrifugue a 1000 × g durante 20 segundos.
4. Coloque uma etiqueta de nova placa de saia completa de bibliotecas e aplique um código de barras de placa de placa.
5. Prepare EtOH a 80% a partir de EtOH absoluto. Combine 40 ml de EtOH a 100% e 10 ml de água sem RNase/DNase. Inverta para misturar.
6. Certifique-se de que o controlo térmico do ML STAR se encontra ligado.

Diluir enzimas

1. Combine a mistura de poliadenilação e o tampão de ressuspensão num tubo de tampa de enroscar. Agite por vórtice para misturar e, em seguida, centrifugue brevemente.

| Tamanho do lote de amostras | Mistura de poliadenilação (µl) | Tampão de ressuspensão (µl) |
|-----------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| 24, 48 | 900 | 1200 |
| 96 | 1800 | 2400 |

2. Combine a mistura de ligação e o tampão de ressuspensão num tubo de tampa de enroscar. Agite por vórtice para misturar e, em seguida, centrifugue brevemente.

| Tamanho do lote de amostras | Mistura de ligação (µl) | Tampão de ressuspensão (µl) |
|-----------------------------|-------------------------|-----------------------------|
| 24, 48 | 230 | 1713 |
| 96 | 440 | 3278 |

Procedimento

1. Selecione **OK** para iniciar a preparação de bibliotecas. Se o **VeriSeq NIPT Method** (Método VeriSeq NIPT) ainda não estiver aberto:
 - a. Abra o AppLauncher e selecione **VeriSeq NIPT Method** (Método VeriSeq NIPT).
 - b. Introduza o ID do lote e o nome de utilizador e, em seguida, selecione **OK**.
2. Confirme que os seguintes consumíveis foram preparados conforme indicado no ecrã Reagent Preparation (Preparação de reagentes):
 - Mistura de poliadenilação, mistura de ligação e EtOH a 80%
 - Esferas de purificação de amostras, mistura de reparação de extremidades e placa adaptadora de ADN NIPT
3. Selecione as caixas de verificação e, em seguida, selecione **OK**.
4. Proceda à leitura dos códigos de barras das caixas de preparação da biblioteca.

5. Introduza o nome de utilizador ou as iniciais do preparador do reagente e, em seguida, seleccione **OK**.
6. Leia os códigos de barras da caixa de acessórios.
7. Introduza o nome de utilizador ou as iniciais do preparador do reagente e, em seguida, seleccione **OK**.
8. Coloque as pontas nos suportes das pontas da forma que se segue e, em seguida, seleccione **OK** para cada suporte.

| Tamanho do lote de amostras | Tipo de suporte | Pista | Item | Posição do local |
|-----------------------------|-----------------|-------|------------------|------------------|
| 24 | Ponta | 1–6 | Pontas de 50 µl | 1 |
| | | 7–12 | Pontas de 300 µl | 1; 2 |
| 48 | Ponta | 1–6 | Pontas de 50 µl | 1; 2 |
| | | 7–12 | Pontas de 300 µl | 1, 2, 3, 4 |
| 96 | Ponta | 1–6 | Pontas de 50 µl | 1, 2, 3, 4 |
| | | 7–12 | Pontas de 300 µl | 1, 2, 3, 4, 5 |

9. Se parou o protocolo depois do procedimento de Extração de cfDNA, coloque as pontas contadas nos suportes de pontas da forma que se segue.

| Tamanho do lote de amostras | Tipo de suporte | Pista | Item | Posição do local |
|-----------------------------|-----------------|-------|-------------------|------------------|
| 24, 48, 96 | Ponta | 49–54 | Pontas de 1000 µl | 1 |
| | | | Pontas de 300 µl | 2 |
| | | | Pontas de 50 µl | 3 |

10. Introduza a localização da primeira ponta de cada rack de pontas e, em seguida, seleccione **OK**.

11. Confirme se os códigos de barras estão afixados e coloque as placas (com o código de barras voltado para a direita) no suporte de placas da forma que se segue e, em seguida, selecione **OK**.

| Tamanho do lote de amostras | Tipo de suporte | Pista | Item | Posição do local |
|-----------------------------|-----------------|-------|--|------------------|
| 24, 48, 96 | Multiflex | 19–24 | Placa de eluição de cfDNA, com código de barras | 1 |
| | | | Placa adaptadora de ADN NIPT, com código de barras | 2 |
| | | | Nova placa de saia completa de 96 poços, bibliotecas, com código de barras | 3 |
| | | | Novas placas de saia completa de 96 poços | 4; 5 |

12. Coloque o suporte de poços profundos da forma que se segue e, em seguida, selecione **OK**.

| Tamanho do lote de amostras | Tipo de suporte | Pista | Item | Posição do local |
|-----------------------------|-----------------|-------|---|------------------|
| 24, 48, 96 | Poço profundo | 39–44 | 50 ml de EtOH a 80% num reservatório de poços profundos | 1 |
| | | | Novas placas de saia completa de 96 poços | 2, 3, 4, 5 |

13. Coloque os tubos de reagente no suporte de reagentes da forma que se segue e, em seguida, selecione **OK**.

| Tamanho do lote de amostras | Tipo de suporte | Pista | Item | Posição do local |
|-----------------------------|-----------------|-------|--|------------------|
| 24, 48, 96 | Reagente | 47 | 2,5 ml de mistura de reparação de extremidades | 1 |
| | | | Mistura de poliadenilação (A-Tailing) preparada (volume total) | 2 |
| | | | Mistura de ligação preparada (volume total) | 3 |
| | | | 10 ml de esferas de purificação de amostras | 4 |
| | | | 12 ml de tampão de hibridização | 5 |

14. Guarde o remanescente dos 12 ml de tampão de hibridização (HT1) no recipiente para pooling.

15. Certifique-se de que os suportes, o material do laboratório e os reagentes são carregados conforme indicado e, em seguida, selecione **OK** no ecrã Library Deck Verification (Verificação da plataforma de bibliotecas).

16. Aguarde pela conclusão da verificação automática do volume de reagente.
17. Observe o ML STAR durante os passos automáticos.
18. Quando solicitado pelo Workflow Manager (Gestor de fluxo de trabalho), certifique-se de que a plataforma de carregamento do ML STAR está livre de obstruções para permitir que o ML STAR descarregue os suportes.
19. Selecione **Unload** (Descarregar) para descarregar a plataforma.
20. Inspeccione a placa de bibliotecas para verificar se os volumes são consistentes em cada poço.



ATENÇÃO

Se os volumes dos poços forem inconsistentes, as amostras podem produzir resultados incorretos.

21. Se armazenar, sele e guarde a placa de bibliotecas.
22. Retire os suportes, limpe a plataforma e, em seguida, selecione **OK**.
23. Introduza comentários sobre os poços afetados e, em seguida, selecione **OK**.
24. Execute um dos seguintes passos:
 - Para continuar para Quantificar bibliotecas, selecione **Yes** (Sim).
 - Para parar, selecione **Exit** (Sair).

PONTO DE PARAGEM DE SEGURANÇA

Se parar, coloque o selo na placa de bibliotecas antes de armazenar. A placa de bibliotecas mantém-se estável até um máximo de 7 dias de armazenamento após a data de preparação de -25 °C a -15 °C.

Quantificar bibliotecas

Preparação

1. Prepare os seguintes reagentes:

| Reagente | Armazenamento | Instruções |
|---|---------------|--|
| DNA Quantification Reagent (Reagente de quantificação de ADN) | 2 °C a 8 °C | Proteja da luz. Descongele à temperatura ambiente durante 30–150 minutos. (Recomenda-se que remova um reagente no início do procedimento de preparação de bibliotecas.) Agite por vórtice para misturar e, em seguida, centrifugue brevemente. |
| DNA Quantification Standard (Padrão de quantificação de ADN) | 2 °C a 8 °C | Agite por vórtice para misturar e, em seguida, centrifugue brevemente. |

| Reagente | Armazenamento | Instruções |
|---|---------------|----------------------------------|
| Resuspension Buffer (Tampão de ressuspensão) | 2 °C a 8 °C | Agite por vórtice para misturar. |

2. Se a placa de bibliotecas foi armazenada congelada, prepare a mesma conforme indicado em seguida.
 - a. Confirme se a placa não está armazenada há mais de sete dias e descongele à temperatura ambiente.
 - b. Agite por vórtex para misturar.
 - c. Centrifugue a 1000 × g durante 1 minuto.
3. Ligue o fluorómetro 10 minutos antes de utilizar.
4. Aplique um código de barras a uma nova placa de 384 poços.
5. Aplique um código de barras a uma nova placa de saia completa.

Procedimento

1. Selecione **OK** para iniciar a quantificação.
2. Se o VeriSeq NIPT Method (Método VeriSeq NIPT) ainda não estiver aberto:
 - a. Abra o AppLauncher e selecione **VeriSeq NIPT Method** (Método VeriSeq NIPT).
 - b. Introduza o ID do lote e o nome de utilizador e, em seguida, selecione **OK**.
3. Leia os códigos de barras da caixa de acessórios.
4. Introduza o nome de utilizador ou as iniciais do preparador do reagente e, em seguida, selecione **OK**.
5. Coloque as pontas no suporte das pontas da forma que se segue e, em seguida, selecione **OK**.

| Tamanho do lote de amostras | Tipo de suporte | Pista | Item | Posição do local |
|-----------------------------|-----------------|-------|-------------------------|------------------|
| 24, 48 | Ponta | 1-6 | Rack da ponta de 300 µl | 1 |
| | | | Rack da ponta de 50 µl | 2 |
| 96 | Ponta | 1-6 | Rack da ponta de 300 µl | 1 |
| | | | Rack da ponta de 50 µl | 2; 3 |

6. Confirme se os códigos de barras estão afixados.
7. Se necessário, retire o selo da placa de bibliotecas.
8. Coloque as placas (com o código de barras voltado para a direita) no suporte Multiflex da forma que se segue e, em seguida, selecione **OK**.

| Tamanho do lote de amostras | Tipo de suporte | Pista | Item | Posição do local |
|-----------------------------|-----------------|-------|---|------------------|
| 24, 48, 96 | Multiflex | 19–24 | Novas placas de saia completa, com código de barras | 1 |
| | | | Nova placa de 384 poços, com código de barras | 2 |
| | | | Placa de bibliotecas, com código de barras | 3 |
| | | | Novas placas de saia completa de 96 poços | 4; 5 |

9. Coloque os tubos de reagente sem tampas no suporte de tubos da forma que se segue e, em seguida, selecione **OK**.

| Tamanho do lote de amostras | Tipo de suporte | Pista | Item | Posição do local |
|-----------------------------|-----------------|-------|---|------------------|
| 24, 48, 96 | Tubo | 46 | DNA Quantification Standard (Padrão de quantificação de ADN) | 1 |
| | | | DNA Quantification Reagent (Reagente de quantificação de ADN) | 2 |

10. Coloque os tubos de reagente no suporte de reagentes da forma que se segue e, em seguida, selecione **OK**.

| Tamanho do lote de amostras | Tipo de suporte | Pista | Item | Posição do local |
|-----------------------------|-----------------|-------|---------------------------------|------------------|
| 24, 48, 96 | Reagente | 47 | Novo tubo de reagente (vazio) | 1 |
| | | | Tampão de ressuspensão de 16 ml | 2 |

11. Se parou o protocolo depois do procedimento de Preparação de biblioteca, coloque as pontas contadas nos suportes de pontas da forma que se segue.

| Tamanho do lote de amostras | Tipo de suporte | Pista | Item | Posição do local |
|-----------------------------|-----------------|-------|-------------------|------------------|
| 24, 48, 96 | Ponta | 49–54 | Pontas de 1000 µl | 1 |
| | | | Pontas de 300 µl | 2 |
| | | | Pontas de 50 µl | 3 |

12. Introduza a localização da primeira e da última ponta de cada rack de pontas e, em seguida, selecione **OK**.
13. Certifique-se de que os suportes, o material do laboratório e os reagentes são colocados conforme indicado e, em seguida, selecione **OK** no ecrã Quant Deck Verification (Verificação da plataforma de quantificação).
14. Aguarde pela conclusão da verificação automática do volume de reagente.
15. Observe o ML STAR durante os passos automáticos.
16. Quando solicitado pelo Workflow Manager (Gestor de fluxo de trabalho), certifique-se de que a plataforma de carregamento do ML STAR está livre de obstruções para permitir que o ML STAR descarregue os suportes.
17. Selecione **Unload** (Descarregar) para descarregar a plataforma.
18. Retire a placa de bibliotecas.
- Inspeccione a placa para verificar se os volumes são consistentes em cada poço.
 - Coloque o selo na placa de bibliotecas e armazene à temperatura ambiente até que a análise de dados fluorométricos seja concluída.
19. Retire as restantes placas de 96 amostras e verifique se os volumes são consistentes em cada poço. Erros importantes no volume podem indicar um problema nos passos de pipetagem.
20. Retire a placa de 384 poços e verifique se existe líquido nos poços apropriados.
21. Coloque um selo de alumínio na placa.
22. Centrifugue a 1000 × g durante 20 segundos.
23. Incube à temperatura ambiente durante 10 minutos, ao abrigo da luz.
24. Retire todos os suportes.
25. Limpe a plataforma do ML STAR e, em seguida, selecione **OK**.



ATENÇÃO

Não elimine os reagentes de quantificação até que os dados sejam obtidos. Os reagentes são necessários caso precise de repetir a quantificação.

26. Após a incubação, remova o selo de alumínio e coloque a placa de 384 poços no leitor de microplacas. Certifique-se de que utiliza a placa adaptadora roxa (número de peça: 0310-4336) fornecida pela Dispositivos moleculares ou equivalente, se aplicável ao instrumento utilizado.

- Certifique-se de que A1 é apresentado no canto superior esquerdo durante o carregamento.
27. Selecione com duplo clique o modelo VeriSeq NIPT para abrir o modelo no SoftMax Pro.
 28. Selecione **New Experiment** (Novo ensaio) no separador Home (Início).
 29. Selecione **Read** (Leitura).
 30. Exporte os dados como XML, da seguinte forma.
 - a. Selecione **Plate** (Placa) com o botão direito e, em seguida, selecione **Rename** (Mudar o nome).
 - b. Leia o código de barras da placa de quantificação e, em seguida, selecione **OK**.
 - c. No canto superior esquerdo do ecrã, selecione o ícone da placa e, em seguida, selecione **Export** (Exportar) no menu.
 - d. Selecione a caixa de verificação **Expt name** (Nome de expt), defina a data da placa como não processada, defina o formato de saída como XML e, em seguida, selecione **OK**.
 - e. Defina o nome e o caminho do ficheiro de saída e, em seguida, selecione **Save** (Guardar).O computador Hamilton tem de ter capacidade de acesso à localização do ficheiro. Não utilize espaços no nome ou no caminho do ficheiro.

Análise

1. No ML STAR, no ecrã Scanner Information (Informações do scanner), introduza o ID do fluorómetro.
2. Introduza comentários sobre a execução do fluorómetro e, em seguida, selecione **OK**.
3. Aceda ao ficheiro de quantificação *.xml que contém os dados fluorométricos e, em seguida, selecione **OK**.
4. Reveja a curva padrão e os resultados da análise de concentração da amostra e, em seguida, selecione **OK**.
5. Se for necessário repetir a leitura da placa, selecione **Rescan** (Repetir leitura).

As amostras são sensíveis ao tempo e à luz. Quando necessário, efetue a repetição da leitura imediatamente.
6. Introduza comentários sobre os poços afetados e, em seguida, selecione **OK**.
7. Avalie os resultados e continue da forma que se segue.
 - Se os resultados forem aprovados na especificação, avance para as [Bibliotecas de pool na página 40](#). Para obter especificações, veja a tabela de métricas e limites de CQ de quantificação apresentada no *Guia do software VeriSeq NIPT Solution v2 (documento n.º 1000000067940)*.
 - Se os resultados falharem a especificação, o sistema interrompe o método. Repita os procedimentos de quantificação, começando pela [Preparação na página 35](#).
8. Execute um dos seguintes passos:
 - Para prosseguir para o [Bibliotecas de pool na página 40](#), selecione **Yes** (Sim).
 - Para parar, selecione **Exit** (Sair).

PONTO DE PARAGEM DE SEGURANÇA

Se parar, coloque o selo na placa de bibliotecas antes de armazenar. A placa de bibliotecas mantém-se estável até um máximo de 7 dias de armazenamento cumulativo entre -25 °C e -15 °C.

Bibliotecas de pool

Preparação

1. Prepare os seguintes reagentes:

| Reagente | Armazenamento | Instruções |
|--|-----------------|--|
| Hybridization Buffer (Tampão de hibridização) | -25 °C a -15 °C | Descongele à temperatura ambiente. Agite por vórtice para misturar. Volte a armazenar após a utilização. |

2. Se a placa de bibliotecas foi armazenada congelada, prepare a mesma conforme indicado em seguida.
 - a. Confirme se a placa não está armazenada há mais de sete dias e descongele à temperatura ambiente.
 - b. Agite por vórtice a 1500 rpm durante 1 minuto.
 - c. Centrifugue a 1000 × g durante 20 segundos.
 - d. Pipete para misturar.
3. Coloque uma etiqueta de Pool A num tubo de pooling vazio. Para 96 amostras, coloque uma segunda etiqueta de Pool B num tubo de pooling vazio.
4. Guarde o seguinte programa de desnaturação no termociclador com uma tampa aquecida.
 - a. Escolha a opção de tampa pré-aquecida e defina para 102 °C.
 - b. Defina o volume de reação para 50 µl.
 - c. Defina a taxa de aumento para o máximo (≥ 2 °C por segundo).
 - d. Incube a 96 °C durante 10 minutos e, em seguida, a 4 °C durante 5 segundos.
 - e. Mantenha nos 4 °C.

Procedimento

1. Coloque a placa de bibliotecas no termociclador pré-programado e execute o programa de desnaturação. Não desnature a placa de bibliotecas antes de a quantificação ser aprovada nas métricas do CQ, uma vez que poderá ser necessário repetir a quantificação.
2. Centrifugue a placa de bibliotecas a 1000 × g durante 20 segundos.
3. Selecione **OK** para iniciar as bibliotecas de pool.
4. Se o VeriSeq NIPT Method (Método VeriSeq NIPT) não estiver aberto:
 - a. Abra o AppLauncher e selecione **VeriSeq NIPT Method** (Método VeriSeq NIPT).
 - b. Introduza o ID do lote e o nome de utilizador e, em seguida, selecione **OK**.
5. Selecione a concentração do pool e, em seguida, selecione **OK**.
A densidade-alvo do cluster é de 220–260 K/mm².

NOTA Poderá ser necessário aumentar as concentrações e/ou os volumes de pooling para os lotes de 24 amostras para manter densidades de cluster semelhantes às dos lotes de 48/96 amostras.

6. Se solicitado pelo Workflow Manager (Gestor de fluxo de trabalho), execute um dos seguintes passos:
 - Para carregar uma ficha de amostras, selecione a ficha de amostras associada ao lote e, em seguida, selecione **Load** (Carregar).
 - Para utilizar os valores predefinidos do sistema para os restantes tipos de amostra, relatório sobre sexo ou tipo de rastreio, selecione **Use Default** (Utilizar predefinição) em cada definição.
Para mais informações sobre a criação de uma ficha de amostras, consulte o *Guia do Software VeriSeq NIPT Solution v2* (documento n.º 1000000067940).
7. Selecione **Start** (Iniciar) para iniciar o temporizador da placa de desnaturação.
8. Coloque as pontas nos suportes de pontas da forma que se segue.

| Tamanho do lote de amostras | Tipo de suporte | Pista | Item | Posição do local |
|-----------------------------|-----------------|-------|---------------------------|------------------|
| 24, 48, 96 | Ponta | 7–12 | Pontas de filtro de 50 µl | 1 |

9. Coloque a placa de biblioteca de desnaturação (com o código de barras voltado para a direita) no suporte Multiflex da forma que se segue e, em seguida, selecione **OK**.

| Tamanho do lote de amostras | Tipo de suporte | Pista | Item | Posição do local |
|-----------------------------|-----------------|-------|--|------------------|
| 24, 48, 96 | Multiflex | 19–24 | Placa de biblioteca de desnaturação (com código de barras) | 1 |

10. Coloque os tubos de pooling no suporte de tubos da forma que se segue e, em seguida, selecione **OK**.

| Tamanho do lote de amostras | Tipo de suporte | Pista | Item | Posição do local |
|-----------------------------|-----------------|-------|---------------------------|------------------|
| 24, 48 | Tubo | 46 | Novo tubo de 2 ml, Pool A | 1 |
| 96 | Tubo | 46 | Novo tubo de 2 ml, Pool A | 1 |
| | | | Novo tubo de 2 ml, Pool B | 2 |

11. Coloque os tubos de reagente no suporte de reagentes da forma que se segue e, em seguida, selecione **OK**.

| Tamanho do lote de amostras | Tipo de suporte | Pista | Item | Posição do local |
|-----------------------------|-----------------|-------|-----------------------------|------------------|
| 24, 48, 96 | Reagente | 47 | Tampão de hibridização 3 ml | 1 |

12. Coloque as pontas nos suportes de pontas da forma que se segue.

| Tamanho do lote de amostras | Tipo de suporte | Pista | Item | Posição do local |
|-----------------------------|-----------------|-------|-----------------------------|------------------|
| 24, 48, 96 | Ponta | 49–54 | Pontas de filtro de 1000 µl | 1 |
| | | | Pontas de filtro de 300 µl | 2 |
| | | | Pontas de filtro de 50 µl | 3 |

13. Introduza a localização da primeira e da última ponta de cada rack de pontas e, em seguida, selecione **OK**.
14. Certifique-se de que os suportes, o material do laboratório e os reagentes são carregados conforme indicado.
15. No ecrã Pooling Deck Verification (Verificação da plataforma de pooling), selecione **OK**.
16. Observe o ML STAR durante os passos automáticos.
17. Introduza comentários sobre os poços afetados e, em seguida, selecione **OK**.
18. Quando solicitado pelo Workflow Manager (Gestor de fluxo de trabalho), certifique-se de que a plataforma de carregamento do ML STAR está livre de obstruções para permitir que o ML STAR descarregue os suportes.
19. Selecione **Unload** (Descarregar) para descarregar a plataforma.
20. Retire o suporte de tubos.
21. Tape cada tubo de pooling, agite em vórtice e centrifugue brevemente.
22. Selecione **OK**.
23. Proceda à sequenciação das bibliotecas assim que possível após o pooling. Sele a placa de bibliotecas e armazene entre os -25 °C e os -15 °C durante até sete dias, para poder repetir o pooling.

PONTO DE PARAGEM DE SEGURANÇA

Se parar, coloque as tampas nos tubos de pooling e armazene a uma temperatura entre -25 °C e -15 °C até um máximo de 7 dias.

Preparar pools de bibliotecas para sequenciação

Preparação

1. Prepare os seguintes reagentes:

| Reagente | Armazenamento | Instruções |
|---------------|-----------------|--|
| Tubos de pool | -25 °C a -15 °C | Se armazenado previamente, descongele à temperatura ambiente. Agite em vórtice brevemente. Centrifugue brevemente. |

2. Prepare o sistema de sequenciação de nova geração preenchendo os seguintes campos do módulo VeriSeq NIPT no Local Run Manager:
 - a. Run Name (Nome do ensaio)
 - b. Run Description (Descrição do ensaio) **(opcional)**
 - c. Pool Barcode (Código de barras do pool)



ATENÇÃO

O Pool Barcode (Código de barras do pool) introduzido no módulo LRM tem de coincidir com o Pool Barcode (Código de barras do pool) introduzido no Workflow Manager (Gestor do fluxo de trabalho). As configurações de ensaios incorretas são rejeitadas pelo software de análise e requerem a repetição da sequenciação.

Para mais informações sobre a utilização do Local Run Manager VeriSeq NIPT Module, consulte o *Guia do Software VeriSeq NIPT Solution v2 (documento n.º 1000000067940)*.

Procedimento

1. Combine os volumes que se seguem no cartucho de reagentes e proceda à pipetagem para misturar.
 - Tampão de hibridização (900 µl)
 - Pool A 450 µl (450 µl)
2. Avance com a sequenciação utilizando um sistema de sequenciação de nova geração, seguindo o guia do sistema.

Guia de referência do seu instrumento de sequenciação de nova geração. Para um NextSeq 550Dx, consulte o *Guia de referência do instrumento NextSeq 550Dx (documento n.º 1000000009513)* ou o *NextSeq 550Dx Instrument Package Insert (Folheto informativo do NextSeq 550Dx Instrument) (documento n.º 1000000043133)*.
3. Confirme a configuração correta do ensaio quando for solicitado.
4. Se necessário, repita este procedimento para o Pool B.
 - Para alcançar um intervalo de densidade do cluster-alvo, pode ser feito um novo pool da placa de bibliotecas utilizando uma concentração de pool diferente no Hamilton. Ao realizar novamente o pool invalida o pool original.
 - Em alternativa, a razão do pool para HT1 (450 µl + 900 µl) pode ser modificada para alcançar um intervalo de densidade do cluster-alvo.

Sequenciação de nova geração

O VeriSeq NIPT Solution v2 pode ser utilizado com um sistema de sequenciação de nova geração com as seguintes especificações:

- Capacidade de 2x36 leituras com extremidades emparelhadas.
- Compatível com adaptadores de índices no VeriSeq NIPT Sample Prep.

- Química de dois canais.
- Produção automática de ficheiros .BCL (dados não processados do instrumento de sequenciação).
- 400 milhões de leituras de extremidades emparelhadas por ensaio.
- Compatível com o VeriSeq NIPT Assay Software v2.

O NextSeq 550Dx é compatível com o VeriSeq NIPT Solution v2.

Análise de dados de sequência

Após a conclusão da sequenciação, os dados da sequenciação são enviados automaticamente para o VeriSeq NIPT Assay Software v2 para análise e geração de relatórios. O relatório inclui classificações de cada amostra do lote, bem como uma avaliação de todos os indicadores de CQ do ensaio. O processo de análise desde a conclusão da sequenciação até aos resultados finais demora cerca de 4 horas num lote de 48 amostras. Para obter informações detalhadas sobre a análise de dados e o ficheiro de saída, consulte o *Guia do software VeriSeq NIPT Solution v2 (documento n.º 1000000067940)*.

Interpretação dos resultados

O algoritmo do VeriSeq NIPT Solution v2 tem um modelo estatístico sofisticado que combina vários tipos diferentes de informações do conjunto de fragmentos de bibliotecas de sequenciação de extremidade emparelhada. Este modelo é utilizado para detetar regiões do genoma que estão sub-representadas ou sobre-representadas na biblioteca de cada amostra. Ainda mais importante, este modelo considera se o grau de uma sobre-representação ou sub-representação é quantitativamente consistente com um evento de aneuploidia no genoma fetal ao nível da fração fetal estimada para a biblioteca.

Relativamente a todos os cromossomas, os dados de sequenciação de extremidades emparelhadas são alinhados com o genoma de referência (HG19). As leituras alinhadas não duplicadas únicas são agregadas em contentores de 100 Kb. As contagens de contentores correspondentes são ajustadas ao desvio de GC e de acordo com a cobertura genómica específica da região estabelecida anteriormente. Mediante a utilização destas contagens de contentores normalizadas, são derivadas pontuações estatísticas para cada autossoma ao comparar as regiões de cobertura que podem ser afetadas pela aneuploidia com os autossomas restantes. É calculada uma razão de verosimilhança de registo (LLR) para cada amostra tendo em conta estas pontuações baseadas na cobertura e a fração fetal estimada. A LLR é a probabilidade de uma amostra ser afetada tendo em conta a cobertura observada e a fração fetal versus a probabilidade de uma amostra não ser afetada dada a mesma cobertura observada. O cálculo desta razão também considera a incerteza estimada relativamente à fração fetal. Para cálculos subsequentes, é utilizado o logaritmo natural da razão. O Assay Software avalia a LLR de cada cromossoma visado e cada amostra para fornecer a determinação de aneuploidia.

Durante a criação de lotes, tem de definir o tipo de uma amostra (unifetal ou de gémeos), o tipo de rastreio (básico ou genómico) e a comunicação do cromossoma sexual (Sim, Não e SCA) pretendido em cada amostra. Em conjunto, estas opções determinam as informações reportadas para cada amostra.

Para todos os tipos de amostra, o tipo de rastreio determina as anomalias autossómicas que são reportadas. No tipo de rastreio básico, são reportados apenas os eventos de trissomia total nos cromossomas 13, 18 e 21. No tipo de rastreio genómico, é reportada qualquer eliminação ou duplicação total ou parcial de qualquer cromossoma autossómico. O tamanho mais pequeno reportável de duplicação ou eliminação parcial cromossómica é de 7 Mb.

Em amostras unifetais, pode desativar a opção para reportar o cromossoma sexual. Também pode configurar para reportar aneuploidias do cromossoma sexual reportando ou não o sexo das amostras euploides.

Em amostras de gémeos, se selecionar Yes (Sim) para reportar o cromossoma sexual, o resultado será limitado à presença ou ausência de um cromossoma Y na biblioteca. Não é possível reportar uma aneuploidia do cromossoma sexual em amostras de gémeos.

Um resultado de ANOMALY DETECTED (ANOMALIA DETETADA) indica que os rastreios são positivos para uma ou mais anomalias de acordo com o tipo de rastreio selecionado e com a opção para reportar o cromossoma sexual. Quando uma anomalia é detetada, o relatório fornece uma descrição da anomalia na notação citogénica.

O VeriSeq NIPT Assay Software v2 utiliza as estatísticas geradas durante a sequenciação para fornecer uma estimativa da fração fetal (EFF) para cada amostra. A EFF é o componente fetal estimado de cfDNA que é recuperado pelo ensaio e reportado como percentagem arredondada para cada amostra. O desvio padrão médio desta estimativa em todas as amostras é de 1,3%. Não pode utilizar isoladamente a EFF para excluir amostras quando reportar resultados.

Para proceder a identificações de representação cromossómica, o VeriSeq NIPT Assay Software v2 utiliza o iFACT (teste individual de confiança de aneuploidia fetal), um indicador de limiar dinâmico que indica se o sistema gerou uma cobertura suficiente de sequenciação, tendo em conta a estimativa de fração fetal para cada amostra. Só são reportadas identificações negativas se a amostra cumprir o limiar do iFACT. Se uma amostra não atingir este limiar, a avaliação do controlo de qualidade apresenta FAILED iFACT (iFACT FALHADO) e o sistema não gera um resultado.

Além do iFACT, o VeriSeq NIPT Assay Software v2 avalia várias outras métricas de CQ durante a análise. As métricas adicionais incluem avaliações de uniformidade de cobertura em regiões genómicas de referência e a distribuição dos tamanhos dos comprimentos de fragmentos de cfDNA. A avaliação de controlo de qualidade apresenta um sinalizador de controlo de qualidade ou uma falha de controlo de qualidade relativamente a indicadores que estejam fora do intervalo aceitável. Em caso de falha de controlo de qualidade, o sistema não gera um resultado para a amostra. Se uma amostra falhar no CQ, a amostra pode ser novamente processada desde que haja um volume de plasma suficiente no tubo de colheita de sangue.

O VeriSeq NIPT Solution v2 gera dados para serem utilizados num relatório final. Não gera um relatório final para o paciente. Os clientes são responsáveis pelo formato e pelo conteúdo do relatório final fornecido ao médico no ponto de atendimento. A Illumina não é responsável pela precisão dos termos do relatório final do cliente.

**ATENÇÃO**

Verifique as estimativas de fração fetal de todas as amostras. Se as estimativas de fração fetal forem semelhantes para todas as amostras num ensaio, poderá ter ocorrido a junção das amostras e esta pode ter afetado os resultados. Contacte o Suporte Técnico da Illumina para obter ajuda na resolução do problema.

Características de desempenho

Os seguintes dados descritos nas secções de desempenho clínico e desempenho analítico foram gerados com os protocolos e os materiais descritos nas Instruções de utilização começando pelo plasma. Todos os dados de sequenciação para esta secção foram gerados num sistema de sequenciação NextSeq 500/550 ou num sistema de sequenciação NextSeq 550Dx com as seguintes configurações:

| | NextSeq 500/550 | NextSeq 550Dx |
|----------------------------|---|---|
| Software no instrumento | NextSeq Control Software 4.0 | NextSeq Operating Software 1.3 |
| Versão do Kit de reagentes | NextSeq 500/550 High Output v2.5 (75 cycle) Reagent Kit | NextSeq 550Dx High Output v2.5 (75 cycle) Reagent Kit |
| Método de sequenciação | Ensaio de sequenciação de extremidades emparelhadas 2x36 no modo de saída elevado | Ensaio de sequenciação de extremidades emparelhadas 2x36 no modo de saída elevado |

Estudo clínico

A precisão clínica do VeriSeq NIPT Solution v2 foi demonstrada através da avaliação de amostras de plasma de mulheres grávidas com gestações unifetais ou de gémeos. As amostras foram obtidas a partir de amostras de plasma não identificadas, anteriormente processadas a partir de amostras de sangue total periférico. Foram consideradas mais de 45 000 amostras para inclusão no estudo. Estas amostras foram sujeitas a exames pré-natal prévios para detetar aneuploidias fetais dos cromossomas e eliminações parciais e duplicações de 7 Mb ou mais. Todas as amostras de gestações afetadas e um subconjunto de amostras consecutivas de gestações não afetadas foram elegíveis para serem testadas, caso os resultados clínicos estivessem disponíveis e fossem cumpridos os critérios da amostra. Foram incluídas no conjunto de testes de análise 2335 amostras no total. Deste conjunto, 2328 amostras eram de gestações unifetais e sete amostras eram de gestações de gémeos. Destas amostras, 28 (1,2%, 28/2335) amostras falharam o controlo de qualidade do ensaio na primeira passagem durante a análise dos dados de sequenciação concluídos:

- 27 falhas iFACT (uma XO, 26 não afetadas).
- Uma falha para dados fora do intervalo esperado.

Dados demográficos e características da gestação

A [Tabela 7](#) apresenta um resumo da idade materna, idade gestacional e trimestre de gestação, para as amostras do exame do genoma, incluindo amostras conhecidas de mosaico. A maioria (98%) das amostras de teste corresponde ao primeiro trimestre da gravidez.

Foram avaliados os dados demográficos entre os coortes básicos e de genoma que não revelaram qualquer diferença estatística. Os dados demográficos e as características da gestação eram semelhantes independentemente da inclusão ou exclusão de mosaicos.

Tabela 7 Dados demográficos e características da gestação

| Estatística de resumo | Genoma (incluindo mosaicos conhecidos) |
|---|---|
| Número de amostras | 2307* |
| Idade materna – anos | |
| Média | 35,08 |
| Desvio padrão | 4,04 |
| Mediana | 34,95 |
| 25.º percentil, 75.º percentil | 32,31; 37,79 |
| Mínimo, máximo | 20,22; 53,02 |
| Idade gestacional no momento da colheita de sangue - semanas | |
| Média | 10,93 |
| Desvio padrão | 1,20 |
| Mediana | 10,57 |
| 25.º percentil, 75.º percentil | 10,29; 11,14 |
| Mínimo, máximo | 10,00; 27,86 |
| Trimestre de gravidez – n (%) | |
| < Primeiro (< 14 semanas) | 2252 (98%) |
| Segundo | 54 (2%) |
| Terceiro (≥ 27 semanas) | 1 (0%) |

* As amostras finais apresentadas continham 7 gémeos.

Desempenho clínico

Os resultados identificados pelo VeriSeq NIPT Solution v2 foram comparados com os resultados padrão de referência clínica. Todas as amostras do estudo tiveram resultados padrão de referência clínica (verdade clínica) relacionados com um estado de aneuploidia fetal cromossômica e eliminações parciais e duplicações de 7 Mb ou mais. O resultado padrão de referência clínica das amostras incluídas neste estudo depende dos resultados da análise cromossômica ou de um exame físico de um recém-nascido com um rastreio negativo do NIPT baseado em NGS. Os colaboradores do estudo com formação realizaram a classificação dos dados padrão de referência clínica, de acordo com o documento de Codificação médica do patrocinador.

Os métodos de análise cromossômica incluíram a cariotipagem, a hibridação fluorescente in situ (fluorescence in situ hybridization, FISH) ou a hibridação genômica comparativa por microarrays (chromosome microarray, CMA). A análise cromossômica foi realizada em sangue periférico ou saliva de recém-nascidos ou bebês, amostras de produtos de concepção (products of conception, POC), amniócitos, vilosidade coriônica, tecidos placentários ou sangue do cordão umbilical pós-parto.

O mosaicismismo é definido pela presença de duas ou mais linhas celulares de diferentes composições cromossômicas num indivíduo. As linhas celulares têm origem no mesmo zigoto. O tipo e o nível de mosaicismismo varia e está dependente da ocorrência dos eventos de mosaico durante a embriogénese e do desenvolvimento fetal. Diferentes tipos de mosaicismismo aparecem em diagnósticos pré-natais consoante a distribuição de linhas celulares com anomalias versus linhas celulares normais no citotrofoblasto, na mesenquima ou no feto.¹⁰ Embora possa ser observado mosaicismismo com qualquer anomalia cromossômica, a prevalência de mosaicismismo em trissomias raras é superior do que nas trissomias dos cromossomas 21, 18 e 13 (T21, T18 e T13).¹¹ Na avaliação de desempenho, os casos de mosaico foram incluídos na análise de genoma, uma vez que a finalidade deste tipo de rastreio é detetar aneuploidias autossômicas raras (rare autosomal aneuploidies, RAA).

Desempenho de rastreio básico

Para o rastreio básico, as anomalias incluem a T21, a T18 e a T13. Foram incluídas na análise 2243 amostras de gestações unifetais e de gémeos, no total. As sete gestações de gémeos foram corretamente detetadas como T21 e não foram reportadas na tabela seguinte.

Tabela 8 Sensibilidade e especificidade do VeriSeq NIPT Solution v2 na deteção de trissomias 21, 18 e 13 num rastreio básico em gestações unifetais (excluindo mosaicos conhecidos)

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

O desempenho do ensaio no rastreio básico conforme observado na [Tabela 8](#) é calculado ao excluir um subconjunto de 64 amostras afetadas pelas RAA, deleções ou duplicações parciais autossómicas ou mosaïcismo conhecido. Estas 64 amostras incluíram oito mosaicos de T21 e três de T18. Cinco destas 11 amostras foram identificadas como afetadas com a anomalia detetada pelo VeriSeq NIPT Assay Software v2.

Desempenho do rastreio genómico

No rastreio genómico, qualquer anomalia inclui trissomias, monossomias e eliminações parciais ou duplicações de 7 Mb ou mais. As amostras do rastreio genómico continham 36 amostras com mosaïcismo conhecido. Foram testadas 2307 amostras de gestações unifetais e de gémeos, no total. As sete gestações de gémeos foram corretamente detetadas como tendo uma anomalia no cromossoma 21 que não foi reportada nas tabelas seguintes.

Desempenho do rastreio genómico de qualquer anomalia

Tabela 9 Sensibilidade e especificidade do VeriSeq NIPT Solution v2 para detetar qualquer anomalia no rastreio genómico (incluindo mosaicos conhecidos)

| | Sensibilidade | Especificidade |
|--------------------|-----------------|--------------------|
| Estimativa % (n/N) | 95,5% (318/333) | 99,34% (1954/1967) |
| IC 95% bilateral | 92,7%, 97,3% | 98,87%, 99,61% |

Desempenho do rastreio genómico em aneuploidia autossómica rara

Tabela 10 Sensibilidade e especificidade do VeriSeq NIPT Solution v2 para detetar aneuploidia autossómica rara (RAA) em rastreios genómicos (incluindo mosaicos conhecidos)

| | Sensibilidade | Especificidade |
|--------------------|---------------|--------------------|
| Estimativa % (n/N) | 96,4% (27/28) | 99,80% (2001/2005) |
| IC 95% bilateral | 82,3%, 99,4% | 99,49%, 99,92% |

Desempenho do rastreio genómico em eliminações parciais e duplicações

Tabela 11 Sensibilidade e especificidade do VeriSeq NIPT Solution v2 para detetar eliminações parciais e duplicações de 7 Mb ou mais no rastreio genómico (incluindo mosaicos conhecidos)

| | Sensibilidade | Especificidade |
|--------------------|---------------|--------------------|
| Estimativa % (n/N) | 74,1% (20/27) | 99,80% (2000/2004) |
| IC 95% bilateral | 55,3%, 86,8% | 99,49%, 99,92% |

Diferenças no desempenho entre o rastreio básico e genómico

A metodologia de pontuação para trissomias comuns e aneuploidias dos cromossomas sexuais é igual para o rastreio básico e genómico. O rastreio básico aplica apenas o algoritmo à T21, T18 e T13. No entanto, o rastreio genómico expande esta metodologia para avaliar todas as trissomias e RAA e as duplicações e deleções parciais.

Existem duas diferenças referentes à apresentação do desempenho descrito entre o rastreio básico e genómico. Em primeiro lugar, para o rastreio genómico, as amostras com mosaïcismo conhecido para trissomias comuns e RAA, deleções e duplicações parciais foram incluídas para a métrica do desempenho. Em segundo lugar, o rastreio genómico pode, preferencialmente, apresentar a deteção de uma duplicação ou deleção parcial numa trissomia completa. A presença de uma trissomia completa para além de uma duplicação ou deleção parcial pode ser observada ao consultar a pontuação LLR fornecida no relatório complementar.

Inclusão de mosaicos no rastreio genómico

O mosaïcismo está listado como uma limitação deste ensaio. Quando o mosaïcismo está presente, o sinal fetal de uma anomalia é reduzido e, por conseguinte, pode ser mais desafiante de detetar sem comprometer a especificidade geral do ensaio. No entanto, uma vez que o mosaïcismo é mais relevante para conteúdo alargado, as amostras com mosaïcismo foram incluídas no rastreio genómico.

Das 64 amostras incluídas no rastreio genómico, mas não no rastreio básico, 36 amostras foram identificadas como tendo mosaïcismo pelo padrão de referência clínica. Das 36 amostras, 23 identificações corresponderam ao padrão de referência clínica.

Eliminação parcial ou duplicação versus deteção de aneuploidia em cromossoma inteiro

O VeriSeq NIPT Solution v2 inclui opções para rastreios básicos e genómicos. No rastreio básico, um resultado de ANOMALY DETECTED (ANOMALIA DETETADA) só é reportado quando uma aneuploidia total for detetada nos cromossomas 21, 18 ou 13 e se todas as métricas de controlo de qualidade forem cumpridas. No rastreio genómico, o sistema deteta aneuploidia em todos os autossomas e eventos de duplicação e eliminação parcial de pelo menos 7 Mb.

Ao utilizar o rastreio genómico, quando um evento de um cromossoma inteiro e um evento de CNV (Copy Number Variants, variações no número de cópias) no mesmo cromossoma excedem o limiar de LLR (Log likelihood ratios, razões de verosimilhança de registos), o sistema dá precedência de comunicação a um evento de duplicação ou eliminação parcial na identificação de um cromossoma inteiro se o tamanho da duplicação ou eliminação parcial abranger aproximadamente 75% ou menos do cromossoma no qual o evento é detetado. Se a região de duplicação ou eliminação parcial detetada for superior a 75% do tamanho do cromossoma, o evento é comunicado como monossomia ou trissomia total de todo o cromossoma se, simultaneamente, o limiar de LLR para o cromossoma inteiro também for excedido. Em virtude disto, duplicações e eliminações substancialmente grandes e que sejam iguais ou inferiores a 75% do tamanho do cromossoma podem ser indicativas de uma aneuploidia do cromossoma inteiro.

Em todas as amostras, a pontuação LLR da classificação do cromossoma inteiro está disponível no relatório complementar. Deve rever a pontuação LLR em relação ao limite especificado na [95% de probabilidades de deteção para a média de regiões por tamanho do VeriSeq NIPT Solution v2 na página 62](#) antes de interpretar o resultado. Por exemplo, uma identificação de CNV em que as pontuações LLR ao nível do cromossoma que ultrapassem o limite fornecem mais suporte para uma interpretação consistente com uma aneuploidia do cromossoma inteiro. Consulte a [Tabela 12](#), para exemplo.

No estudo clínico houve duas amostras de gestação unifetal com duplicações substancialmente grandes (uma no cromossoma 21 e uma no cromossoma 18) e que eram inferiores a 75% do tamanho relativo do cromossoma (consulte a [Tabela 12](#)). Ambos os eventos foram reportados como duplicações parciais e não como trissomia total desse cromossoma. As pontuações LLR destes eventos estavam acima do limite consistente com um resultado afetado de uma trissomia total. Quer seja numa identificação de duplicação parcial ou numa trissomia total, a gestão de acompanhamento de uma identificação positiva do NIPT oferece ao paciente um teste de confirmação através de diagnóstico pré-natal.

Tabela 12 Exemplos de eventos de duplicação grande identificados no rastreio genómico

| | Verdade clínica | Resultado do sistema genómico | Tamanho da anomalia (Mb) | % do cromossoma | Pontuações LLR |
|-----------|------------------------|--------------------------------------|---------------------------------|------------------------|-----------------------|
| Amostra 1 | Trissomia 21 unifetal | Duplicação parcial no cromossoma 21 | 22,50 | 48,9 | 19,43 |
| Amostra 2 | Trissomia 18 unifetal | Duplicação parcial no cromossoma 18 | 47,00 | 60,2% | 12,99 |

Consulte o *Guia do Software VeriSeq NIPT Solution v2 (documento n.º 1000000067940)* para obter informações adicionais sobre as métricas de Controlo de qualidade utilizadas para reportar resultados de aneuploidia.

Cromossomas sexuais

Os resultados do cromossoma sexual do VeriSeq NIPT Solution v2 foram comparados com os resultados padrão de referência clínica e estão resumidos na tabela seguinte. A concordância de percentagem foi calculada para cada cromossoma sexual em cada resultado padrão de referência clínica. A concordância de percentagem foi calculada como o número de amostras em que a identificação do cromossoma sexual pelo VeriSeq NIPT Solution v2 correspondeu à classificação padrão de referência clínica, dividido pelo número total de amostras com a mesma classificação padrão de referência clínica.

Tabela 13 Concordância percentual para classificação sexual fetal*

| Classificação sexual fetal | Carió-tipo | Fenótipo de um exame físico a um recém-nascido | | Resultados citogenéticos | | | | | | | |
|-----------------------------|------------|--|------------|--------------------------|-----|------|-----|-----|------|---------------|---------------|
| | | Femi-nino | Mascu-lino | XX | XY | XO | XXX | XXY | XYY | Outro** | Em falta |
| Anomalia não detetada | XX | 997 | 0 | 21 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Anomalia não detetada | XY | 0 | 966 | 0 | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Anomalia detetada | XO | 0 | 0 | 0 | 0 | 19 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| Anomalia detetada | XXX | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 17 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Anomalia detetada | XXY | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 23 | 0 | 1 | 0 |
| Anomalia detetada | XYY | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 11 | 0 | 0 |
| Total | | 997 | 966 | 21 | 15 | 21 | 17 | 23 | 12 | 2 | 1 |
| Concordância da percentagem | | 100 | 100 | 100 | 100 | 90,5 | 100 | 100 | 91,7 | Não aplicável | Não aplicável |

* Cinco gestações de gémeos foram corretamente classificadas com a presença do cromossoma Y. Duas gestações foram corretamente classificadas como ausência do cromossoma Y.

** Outros resultados citogenéticos foram XXXXX e XXYY.

Valor preditivo positivo e valor preditivo negativo do VeriSeq NIPT Solution v2

O valor preditivo positivo (VPP) e o valor preditivo negativo (VPN) do teste fornecem informações sobre a capacidade do teste para fundamentar decisões clínicas com base na sensibilidade e na especificidade do teste, e testar previamente a probabilidade de um feto ser afetado por trissomia (prevalência). Uma vez que o VPP e o VPN dependem da prevalência e a prevalência destas aneuploidias pode variar em diferentes populações de indivíduos, o VPP e o VPN foram calculados num intervalo de valores de prevalência plausível,

com base nos valores de sensibilidade e especificidade observados no rastreio básico (sem mosaicos conhecidos) do estudo de precisão clínica. A [Tabela 17](#) baseia-se no rastreio genómico (com mosaicos conhecidos).

Tabela 14 Prevalência de trissomia 21, VPP e VPN no rastreio básico (excluindo mosaicos conhecidos)

| Prevalência (%) | VPP (%) | VPN (%) |
|-----------------|---------|---------|
| 0,05 | 33,17 | > 99,99 |
| 0,10 | 49,82 | > 99,99 |
| 0,20 | 66,53 | > 99,99 |
| 0,50 | 83,29 | > 99,99 |
| 1,00 | 90,93 | > 99,99 |
| 1,50 | 93,79 | > 99,99 |
| 2,00 | 95,29 | > 99,99 |

Tabela 15 Prevalência de trissomia 18, VPP e VPN no rastreio básico (excluindo mosaicos conhecidos)

| Prevalência (%) | VPP (%) | VPN (%) |
|-----------------|---------|---------|
| 0,03 | 23,06 | > 99,99 |
| 0,05 | 33,31 | > 99,99 |
| 0,10 | 49,99 | > 99,99 |
| 0,20 | 66,68 | > 99,99 |
| 0,30 | 75,03 | > 99,99 |
| 0,40 | 80,04 | > 99,99 |
| 0,50 | 83,38 | > 99,99 |

Tabela 16 Prevalência de trissomia 13, VPP e VPN no rastreio básico (excluindo mosaicos conhecidos)

| Prevalência (%) | VPP (%) | VPN (%) |
|-----------------|---------|---------|
| 0,01 | 9,10 | > 99,99 |
| 0,02 | 16,68 | > 99,99 |
| 0,05 | 33,37 | > 99,99 |
| 0,10 | 50,05 | > 99,99 |
| 0,20 | 66,73 | > 99,99 |

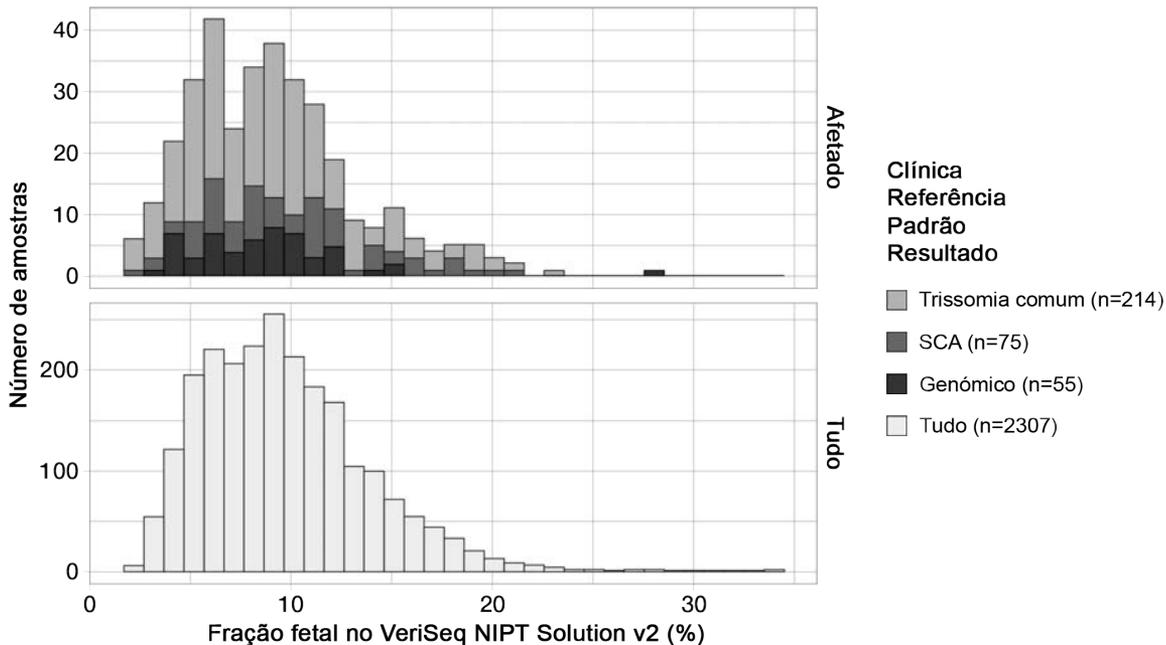
Tabela 17 Prevalência de qualquer anomalia, VPP e VPN em rastreios genómicos (incluindo mosaicos conhecidos)

| Prevalência (%) | VPP (%) | VPN (%) |
|-----------------|---------|---------|
| 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 |

Distribuição da fração fetal

As estimativas da distribuição da fração fetal (FF) do VeriSeq NIPT Solution v2 do rastreio do genoma com mosaicos são demonstradas através da categoria do resultado padrão de referência clínica na [Figura 1](#).

Figura 1 Distribuição da fração fetal



5 amostras tinham anomalias em várias categorias.
 A trissomia comum inclui amostras com trissomia 21, 18 e/ou 13.
 Genómico inclui as amostras com RAA ou duplicações e/ou eliminações parciais.

As estimativas da FF variaram entre 2% e 34% no geral com uma mediana de 9% e intervalo interquartil (IQ) de 6% a 12%. A estimativa mediana da FF para trissomias comuns e eventos detetados por rastreio de genoma é de 8% e para SCA é de 9%. O intervalo em estimativas da FF foi consistente em todos os resultados. Não existe desvio aparente na distribuição da FF entre as trissomias comuns, SCA, eventos detetados pelo rastreio genómico ou todas as amostras na análise genómica.

Desempenho em gestações de gémeos

Estimativa do desempenho de Trissomia 13, 18 e 21 e do Cromossoma Y em gestações de gémeos

Devido à baixa prevalência de trissomia 21, 18 e 13 em gestações de gémeos, só estava disponível para o estudo clínico um pequeno número de amostras de gémeos afetadas. Para estimar o desempenho do VeriSeq NIPT Solution v2 em gestações de gémeos, foram utilizados modelos *in silico* baseados em observações de amostras clínicas para simular populações de gestações de gémeos. Esta simulação foi consistente com a população prevista. A distribuição da fração fetal foi determinada através de cerca de 4500 amostras de gémeos e foi comparada com a distribuição de cerca de 120 000 amostras unifetais. A distribuição da fração fetal condicionada ao estado de aneuploidia foi determinada a partir de supostas identificações de gestações unifetais (1,044 trissomia 21, 307 trissomia 18 e 192 trissomia 13). Combinar as duas distribuições permitiu interferências de deteção de aneuploidia em gémeos. Foram simulados conjuntos de gémeos

dizigóticos e monozigóticos e foi obtida uma média ponderada que representasse a sua prevalência na população de utilização prevista (2 dizigóticos: 1 monozigótico) para estimar a sensibilidade. Para a especificidade, foram simulados conjuntos de gémeos não afetados.

A fração de cada amostra simulada afetada pela trissomia (ou seja, a fração afetada) foi calculada de forma diferente para cada categoria de amostra:

- Para gémeos monozigóticos, a fração afetada de cada amostra foi definida para 1,0 porque, nesta situação, a trissomia afeta ambos os gémeos.
- Para gémeos dizigóticos, assumiu-se que apenas um gémeo era afetado (é extremamente raro ambos os gémeos dizigóticos serem afetados). Os valores de fração fetal afetados foram simulados utilizando as razões de distribuição conhecida de fração fetal, conforme determinado em amostras clínicas de gémeos de sexo dissonante. Foi aplicada uma abordagem conservadora, na qual se assumiu que o gémeo afetado teve sempre a fração fetal mais reduzida dos dois gémeos. Foi aplicado um fator de correção para as frações fetais que em média são inferiores em gestações com trissomia 13 e 18.
- Para os gémeos não afetados, a fração afetada de cada amostra foi definida para zero.

No caso de gémeos afetados por trissomia 18 ou 13, a fração fetal correspondente à fração afetada da amostra foi reduzida. A redução foi proporcional à redução média da fração fetal observada nos dados clínicos de trissomia 18 ou 13 unifetal versus casos de euploide unifetal.

Tanto a fração fetal global, como a fração afetada de cada amostra simulada foram depois utilizadas para calcular uma pontuação de aneuploidia utilizando o algoritmo padrão do VeriSeq NIPT Solution v2. A sensibilidade foi calculada ao determinar com que frequência as pontuações de aneuploidia para os gémeos afetados simulados eram superiores ao limite de aneuploidia correspondente. Paralelamente, a especificidade foi calculada ao determinar com que frequência as pontuações de aneuploidia para os gémeos não afetados simulados eram inferiores ao limite de aneuploidia correspondente ([Tabela 18](#)). Os intervalos de confiança de 95% foram estimados com base no número de amostras clínicas reais de gémeos no conjunto de dados original, que foram classificados como afetados ou não afetados pela trissomia relevante.

Para estimar a sensibilidade do cromossoma Y em amostras de gémeos, foram simulados conjuntos de gémeos XY/XY e XX/XY. Foi feita uma média ponderada representativa da sua prevalência na população prevista (1 XY/XY: 1 XX/XY). Para estimar a especificidade do cromossoma Y em gémeos, foi simulado um conjunto de gémeos XX/XX. Foram simulados os valores globais da fração fetal de acordo com a distribuição conhecida da fração fetal em amostras clínicas de gémeos.

No caso de gémeos XY/XY e XX/XY, as pontuações do cromossoma Y foram estimadas através da relação conhecida entre a fração fetal e as pontuações do cromossoma Y em amostras clínicas unifetais, classificadas como masculino. Apenas no caso de gémeos XX/XY, os valores de fração fetal afetados (p. ex., masculino) foram simulados utilizando as razões de distribuição conhecida de fração fetal observadas entre gémeos da mesma gravidez, conforme determinado em amostras clínicas de gémeos de sexo dissonante. Foi adotada uma abordagem conservadora em que a fração afetada foi selecionada de forma a corresponder ao mais pequeno dos dois gémeos. Para cada amostra simulada XX/XY, a pontuação do cromossoma Y foi multiplicada pela fração afetada.

No caso de gémeos XX/XX, as pontuações do cromossoma Y foram incluídas na amostra a partir dessas pontuações observadas em amostras clínicas unifetais classificadas como feminino. A pontuação do cromossoma Y e a fração fetal global foram depois utilizadas para classificar cada amostra simulada com o cromossoma Y presente ou com o cromossoma Y ausente utilizando o algoritmo padrão do VeriSeq NIPT Solution v2.

A sensibilidade foi calculada determinando a frequência com que os gémeos simulados XY/XY ou XX/XY foram corretamente classificados como tendo o cromossoma Y presente. A especificidade foi calculada ao determinar com que frequência os gémeos XX/XX simulados foram classificados corretamente como tendo o cromossoma Y ausente. Os intervalos de confiança de 95% foram estimados com base no número de amostras verdadeiras de gémeos clínicos do conjunto de dados original, que foram classificadas como tendo o cromossoma Y presente ou o cromossoma Y ausente.

Tabela 18 Estimativas para trissomia 21, 18 e 13 na população simulada de gestações de gémeos

| | Trissomia 21 | Trissomia 18 | Trissomia 13 | Presença de Y |
|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Sensibilidade | 96,4% | 95,7% | 93,6% | > 99,9% |
| IC 95% bilateral | (86,4%, 98,9%) | (68,3%, 99,4%) | (64,1%, 98,9%) | (99,9%, > 99,9%) |
| Especificidade | 99,9% | > 99,9% | > 99,9% | > 99,9% |
| IC 95% bilateral | (99,8%, > 99,9%) | (99,9%, > 99,9%) | (99,9%, > 99,9%) | (99,7%, > 99,9%) |

A [Tabela 18](#) fornece estimativas pontuais e intervalos de confiança estimada de 95% em relação à sensibilidade e à especificidade do VeriSeq NIPT Solution v2 para detetar trissomia 21, 18, 13 e a presença do Y numa população simulada em gestações de gémeos consistente com a população prevista. Os intervalos de confiança foram estimados com base no número de amostras clínicas de gémeos com aprovação de CQ classificadas como afetados ou não afetados pela trissomia relevante. O cálculo da sensibilidade assume que dois terços de gestações de gémeos afetados são dizigóticos com um gémeo afetado, enquanto um terço das gestações de gémeos afetados são monozigóticos com ambos os gémeos afetados.

As estimativas listadas na [Tabela 18](#) pertencem apenas a gestações de gémeos. Devido a uma prevalência ainda mais baixa, os dados de gestações superiores (trigêmeos ou mais) foram insuficientes para estabelecer modelos estatísticos adequados, para prever a precisão da deteção de aneuploidia.

Desempenho analítico

Precisão

Para avaliar e quantificar a precisão do ensaio, foi realizada uma nova análise dos dados com o software de pipeline para análise VeriSeq NIPT Solution v2 a partir de dois estudos anteriores do VeriSeq NIPT Solution:

- Estudo multicêntrico de reprodutibilidade que incluiu três ensaios por três operadores em três locais, com um único lote de reagente para um total de nove ensaios.

- Estudo de precisão no laboratório que incluiu 12 ensaios num único local utilizando dois ML STARS, dois sistemas de instrumentos de sequenciação e três lotes de reagente de sequenciação.

O objetivo do estudo de precisão era quantificar a precisão do ensaio relativamente à trissomia 21 (T21) e ao cromossoma Y e estimar a variabilidade entre diferentes instrumentos, kits de preparação de bibliotecas e lotes de reagentes de sequenciação.

Foi criado um pool de T21 com 5% de fração fetal combinando o cfDNA extraído do plasma materno de mulheres grávidas (com um feto com T21) e cfDNA extraído de plasma de mulheres não grávidas. Também foi criado um pool de cfDNA materno-masculino (feto XY) com 10% de fração fetal. O painel de amostras para cada estudo em cada ensaio incluiu 4 réplicas com 5% de fração fetal num pool de amostras afetadas por T21 e 20 réplicas com 10% de fração fetal num pool de cfDNA materno-masculino. O exame foi realizado ao longo de 10 dias num total de 21 ensaios para os dois estudos combinados.

A T21 e a presença do cromossoma Y foram selecionados para avaliação com base na representatividade das condições clínicas e da complexidade de deteção de anomalias. Sendo o autossoma humano mais pequeno, o tamanho do cromossoma 21 tem impacto direto na sensibilidade de deteção da T21, especialmente com valores baixos de fração fetal, tais como os que foram utilizados neste estudo. O cromossoma Y, presente no plasma materno, é exclusivamente fetal na origem e, por isso, é mais fácil de detetar no ensaio.

O meio observado e os desvios padrão do cromossoma 21, a pontuação LLR e os valores cromossómicos normalizados (NCV) do cromossoma Y mostraram que a réplica do desvio padrão (DP) era a maior fonte de variabilidade. A variação entre locais, instrumentos e lotes de reagentes adicionou uma quantidade significativa de variabilidade, conforme demonstrado pela diferença entre o DP total e o DP replicado na [Tabela 19](#) e na [Tabela 20](#).

Tabela 19 Resumo de (Reprodutividade) Multisite, Desvio padrão (DP) de resposta de sequenciação

| Resposta | N | Média | DP replicado | DP* da reprodutibilidade total |
|--------------------------------|-----|--------|--------------|--------------------------------|
| Pontuação LLR do cromossoma 21 | 36 | 34,43 | 11,36 | 11,36 |
| Cromossoma Y NCV | 180 | 190,56 | 7,96 | 10,20 |

* O total inclui a variabilidade devido ao local, operador, ensaio, dia e réplica.

Tabela 20 Resumo da precisão da resposta de sequenciação no laboratório

| Resposta | N | Média | DP replicado | DP* total no Lab |
|--------------------------------|-----|--------|--------------|------------------|
| Pontuação LLR do cromossoma 21 | 48 | 36,01 | 9,07 | 10,25 |
| Cromossoma Y NCV | 240 | 198,68 | 7,63 | 7,82 |

* O total inclui a variabilidade devido ao instrumento de sequenciação, lote de reagente, operador, ensaio, dia e réplica.

Foi realizado um estudo adicional para comparar a precisão de sequenciação do VeriSeq NIPT Solution v2 (desvio padrão total) utilizando a versão 2.0 de uma célula de fluxo versus a versão 2.5. O estudo incluiu dois tipos de células de fluxos (v2.0 e v2.5), três lotes de kits de sequenciação, quatro sistemas de instrumentos e dois ensaios de sequenciação por combinação para um total de 48 ensaios num único centro. Foi preparado um pool de sequenciação a partir de placas de cfDNA que foram manualmente preparadas. O painel de amostras

incluiu 4 réplicas com 5% de fração fetal num pool de amostras afetadas por T21 e 20 réplicas com 10% de fração fetal num pool de cfDNA materno-masculino (feto XY). Os resultados do estudo são apresentados na [Tabela 21](#) e suportam a evidência de que não há diferença na precisão de sequenciação ao utilizar a célula de fluxo v2.0 versus a célula de fluxo v2.5.

Tabela 21 Resumo da precisão da resposta de sequenciação da célula de fluxo v2.0 versus a célula de fluxo v2.5

| Resposta | Número de observações por versão | DP* total v2.0 | DP* total v2.5 | Resultado estatístico** |
|--------------------------------|----------------------------------|----------------|----------------|--|
| Pontuação LLR do cromossoma 21 | 96 | 9,56 | 8,44 | Equivalente estatístico (valor p=0,25) |
| Cromossoma Y NCV | 480 | 7,74 | 7,38 | Equivalente estatístico (valor p=0,38) |

* O total inclui a variabilidade devido ao instrumento de sequenciação, lote de reagente, ensaio, dia, réplica.

** Com base no teste F para igualdade das variações (desvios padrão ao quadrado).

Contaminação cruzada

A contaminação cruzada foi avaliada no fluxo de trabalho de preparação de amostras do VeriSeq NIPT Solution. Foram testados pools de plasma de mulheres não grávidas (XX) e homens adultos (XY) num padrão quadriculado no formato de placa de 96 poços em 4 placas. N = 48 cada para cada amostra feminina e masculina por placa, para um total de 192 amostras femininas e 192 amostras masculinas. Nenhuma das amostras femininas demonstrou a cobertura do cromossoma Y que era estatisticamente mais elevado do que a base estimada, não indicando qualquer contaminação cruzada por parte das amostras masculinas na mesma placa. Não foi observada qualquer contaminação cruzada detetável no VeriSeq NIPT Solution.

Substâncias potencialmente interferentes

O impacto de substâncias potencialmente interferentes foi avaliado no VeriSeq NIPT Solution através da avaliação do desempenho do ensaio na presença de tais substâncias.

Colocou-se albumina, bilirrubina, hemoglobina e triglicéridos (endógeno) em pools de plasma materno em gestações de um feto feminino (feto XX) não afetado. Foram testados em duas concentrações para cada substância de teste (n=16 para cada). Não foi observada interferência no desempenho do ensaio.

Tabela 22 Substâncias potencialmente interferentes (endógenas)

| Substância de teste | Concentração de teste baixa (mg/ml) | Concentração de teste alta (mg/ml) |
|---------------------|-------------------------------------|------------------------------------|
| Albumina | 35 | 50 |
| Bilirrubina | 0,01 | 0,15 |
| Hemoglobina | 100 | 200 |
| Triglicéridos | 1,5 | 5 |

O ADN genómico materno que ocorre naturalmente (gDNA) no plasma também pode interferir potencialmente no desempenho do ensaio, pois pode ser extraído juntamente com o cfDNA fetal. Níveis de ADN genómico a 1,6, 3,3, e 4,9 ng por amostra (correspondente a 1, 2 e 3 desvios padrão acima da concentração média de gDNA esperada após 7 dias de armazenamento de sangue total¹²) foram adicionados ao cfDNA extraído do plasma materno de fetos femininos não afetados (feto XX). As amostras foram depois testadas no VeriSeq NIPT Solution (n=16 para cada concentração). Não foi observada qualquer interferência no desempenho do ensaio na presença de níveis elevados de gDNA.

Vinte substâncias potencialmente interferentes à base de medicamentos (exógenas) que são normalmente utilizadas ou prescritas durante a gravidez foram testadas de acordo com a diretriz EP7-A2 (Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline-Second Edition). As 20 substâncias potencialmente interferentes foram combinadas em quatro pools, colocadas no plasma materno de fetos femininos não afetados (feto XX) e testadas no VeriSeq NIPT Solution (N=16 para cada pool). Não foi observada qualquer interferência no desempenho do ensaio na presença destas substâncias exógenas.

Tabela 23 Substâncias potencialmente interferentes (exógenas)

| Pool 1 | Pool 2 | Pool 3 | Pool 4 |
|----------------|---------------|-------------------|-------------------|
| Acetaminofeno | Difenidramina | Albuterol | Cetirizina |
| Acetilcisteína | Eritromicina | Bupropiona | Dextrometorfano |
| Bisoprolol | Guaifenesina | Cafeína | Ácido L-ascórbico |
| Citalopram | Heparina | Sertralina | Metoprolol |
| Desloratadina | Lidocaína | Fluoreto de sódio | Nadolol |

Limite de deteção

O limite de deteção (Limit of Detection, LOD) é definido como o nível de fração fetal que corresponde a 95% de probabilidade de deteção de uma condição de interesse, como a T21. Para avaliar o LOD do VeriSeq NIPT Solution v2 em diversas condições comuns, foram realizados estudos e análises estatísticas.

A probabilidade de deteção de uma condição de interesse numa amostra afetada processada pelo VeriSeq NIPT Solution v2 depende principalmente de três fatores:

- fração fetal
- profundidade de sequenciação
- tamanho e complexidade da região genómica de interesse.

Partindo do princípio de que existe uma profundidade de sequenciação constante, uma determinada anomalia é mais fácil de detetar numa amostra com uma percentagem de fração fetal mais elevada, do que numa amostra com uma percentagem de fração fetal mais baixa. Inversamente, partindo do princípio de que existe uma profundidade de fração fetal constante, uma determinada anomalia é mais fácil de detetar numa amostra com uma profundidade de sequenciação mais elevada, do que numa amostra com uma profundidade de sequenciação mais baixa. Por último, as anomalias em regiões genómicas mais pequenas ou mais complexas são mais difíceis de detetar, do que as anomalias em regiões genómicas maiores ou menos complexas, partindo do princípio de que temos uma fração fetal constante e profundidade de sequenciação.

Para determinar o LOD para a deteção de T21, foram analisadas amostras contendo misturas de amostras de pool de T21 e amostras de pool não afetadas. Os dois tipos de analito foram misturados através de uma série de titulação para criar um conjunto de sete níveis de fração fetal (0, 2, 3, 4, 5, 6 e 10%). Cada nível foi representado por um total de 10 réplicas.

Para aumentar mais a resolução da grelha de fração fetal da análise do LOD, os dados deste estudo foram acrescidos com dados obtidos a partir de uma diluição *in silico*. Os efeitos da titulação e diluição experimentais foram simulados através da mistura controlada dos dados de sequenciação. Os dados desta titulação *in silico* abrangeram um conjunto de 14 níveis de fração fetal (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 e 4,50%) com 32 réplicas para cada nível. Uma análise de probit foi aplicada aos dados resultantes para determinar o LOD para T21.

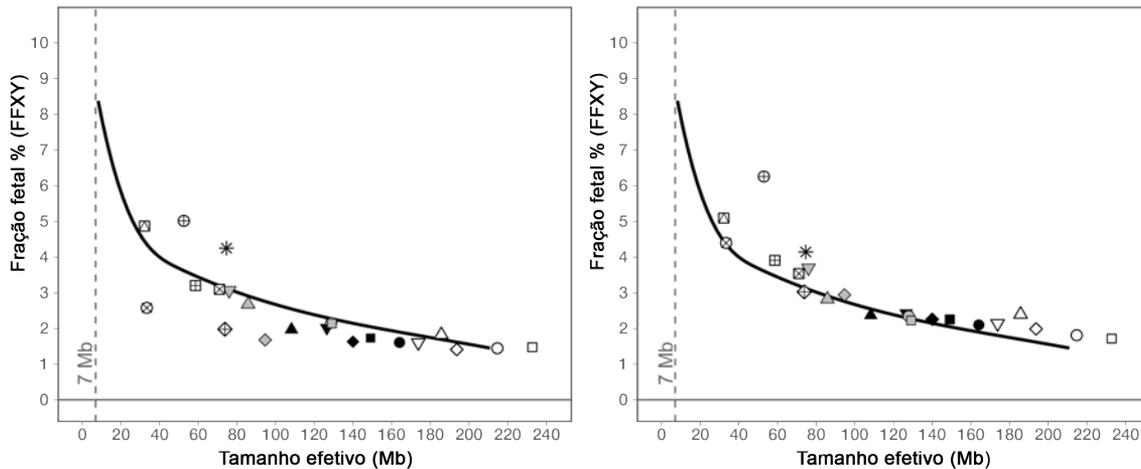
Foi desenvolvido individualmente um modelo estatístico utilizando a fração fetal, a profundidade de sequenciação e o tamanho/complexidade genómicos para prever a probabilidade de deteção de qualquer anomalia em qualquer amostra. Este modelo foi estabelecido a partir dos dados correspondentes a um conjunto de 1405 amostras XY. O LOD para T21, conforme previsto por este modelo, foi determinado para ser concordante com a estimativa à base de probit descrita acima. Este modelo estatístico foi utilizado para estimar valores LOD de aneuploidias em todos os autossomas e para duplicações e eliminações parciais.

A [Figura 2](#) apresenta 95% de probabilidades de deteção para a média de regiões por tamanho e os limites autossómicos de deteção para todas as trissomias e todas as monossomias.

Figura 2 95% de probabilidades de deteção para a média de regiões por tamanho do VeriSeq NIPT Solution v2

O símbolo mostra o limite autossómico de deteção de trissomias

Os símbolos mostram o limite autossómico de deteção de monossomias



| Cr | Símbolo | Trissomia | | Monossomia | |
|----|---------|------------|---------|------------|---------|
| | | Limite LLR | LoD (%) | Limite LLR | LoD (%) |
| 1 | ○ | 7 | 1.44 | 13.2 | 1.80 |
| 2 | □ | 9 | 1.47 | 13.6 | 1.71 |
| 3 | ◇ | 5 | 1.41 | 13.8 | 1.99 |
| 4 | △ | 7 | 1.82 | 15.2 | 2.39 |
| 5 | ▽ | 7.6 | 1.60 | 17 | 2.14 |
| 6 | ● | 7.3 | 1.60 | 15.4 | 2.09 |
| 7 | ■ | 6.6 | 1.73 | 14 | 2.25 |
| 8 | ◆ | 5.8 | 1.63 | 14.8 | 2.25 |
| 9 | ▲ | 8 | 1.97 | 13.6 | 2.37 |
| 10 | ▼ | 8.8 | 2.01 | 14.7 | 2.42 |
| 11 | ⊙ | 12.2 | 2.14 | 15.7 | 2.35 |

| Cr | Símbolo | Trissomia | | Monossomia | |
|----|---------|------------|---------|------------|---------|
| | | Limite LLR | LoD (%) | Limite LLR | LoD (%) |
| 12 | ▣ | 11.6 | 2.14 | 12.8 | 2.22 |
| 13 | ◇ | 3 | 1.68 | 16.5 | 2.94 |
| 14 | △ | 12.7 | 2.68 | 14.7 | 2.82 |
| 15 | ▽ | 9.8 | 3.07 | 16.4 | 3.69 |
| 16 | ▣ | 10.7 | 3.10 | 15.3 | 3.54 |
| 17 | * | 16.8 | 4.25 | 15.7 | 4.14 |
| 18 | ⊕ | 3 | 1.98 | 11.3 | 3.02 |
| 19 | ⊕ | 15.5 | 5.01 | 27.5 | 6.26 |
| 20 | ⊕ | 10.6 | 3.20 | 18.2 | 3.91 |
| 21 | ⊗ | 2.5 | 2.58 | 13.2 | 4.40 |
| 22 | ⊕ | 13.5 | 4.87 | 15.3 | 5.09 |

Resolução de problemas

Resolução de problemas do VeriSeq NIPT Solution v2

| Modo de falha | Resultado possível | Interpretação | Ação recomendada | Comentários |
|---|---|--|---|---|
| Insufficient input plasma (Introdução insuficiente de plasma) | Falha do controlo de qualidade da amostra | Volume de plasma insuficiente. | Repetir colheita | Baseada na inspeção visual do volume do plasma. |
| Blood tube failure (Falha do tubo de sangue) | O sangue não fica separado em camadas | A amostra não foi centrifugada. | Certifique-se de que a centrifugação começou e que o tubo foi rodado com a força correta. Repita a colheita da amostra. | |
| | | Armazenamento ou transporte indevido da amostra (hemólise da amostra). | Repita a colheita da amostra. | As amostras congeladas não se separam. Condições de armazenamento ou transporte indevidos podem causar a hemólise das amostras. |

| Modo de falha | Resultado possível | Interpretação | Ação recomendada | Comentários |
|---|------------------------|---|--|--|
| Sample clog or slow flow (Coágulo da amostra ou fluxo lento) | Contaminação de plasma | As amostras individuais podem coagular a placa de ligação se existir contaminação significativa na amostra de plasma. | Inspeccione a amostra. Se o plasma restante no tubo estiver vermelho ou turvo, cancele a amostra e peça uma nova colheita. Se a amostra tiver um aspeto normal, repita o teste da amostra. | |
| | Excesso de amostra | Inspeção visual inadequada de cada tubo para a adequação da amostra. | Invalide quaisquer amostras nos poços circundantes afetados pelo excesso. | Pode indicar que as amostras foram indevidamente transportadas ou armazenadas antes do processamento. Exclua as amostras inadequadas do processamento. |
| | Avaria de hardware | Digestão inadequada do material durante a extração. | Repita o teste da amostra. Se o problema persistir na localização de poços com outras amostras, contacte o Suporte Técnico da Illumina. | |

| Modo de falha | Resultado possível | Interpretação | Ação recomendada | Comentários |
|---|--|---|---|---|
| Individual Sample Analysis QC failure (Falha do controlo de qualidade da análise de amostra individual) | Falha do controlo de qualidade de sequenciação | As causas possíveis são as seguintes: <ul style="list-style-type: none"> • Introdução de material genético insuficiente • Transferência incorreta durante o manuseamento de amostras • Falha do reagente de sequenciação | Verifique a anotação de amostras. Verifique se existe um desempenho semelhante em amostras anteriores na mesma posição da placa. Repita o teste da amostra. | Indica a introdução de uma amostra insuficiente ou uma transferência incorreta no ML STAR. O material genético insuficiente pode dever-se a insuficiente ADN livre no plasma ou ADN baseado em células que causa a diluição excessiva da amostra para sequenciação. |
| | Contagem baixa de FF ou locais não excluídos (NES) | Dados insuficientes gerados para criar relatório preciso. | Repita o teste de plasma. | |

| Modo de falha | Resultado possível | Interpretação | Ação recomendada | Comentários |
|---|--|---|--|---|
| Quantification QC failure (Falha do controlo de qualidade de quantificação) | Falha no ensaio de quantificação. Mediana de lote abaixo do mínimo | Processo de produção insuficiente. | Repita a quantificação. Se a repetição falhar, contacte o Suporte Técnico da Illumina. | Os indicadores de curva padrão de reprovação indicam problemas na preparação da biblioteca (isto é, utilização de etanol não adequado para biologia molecular) ou problemas no processo de quantificação. |
| | Falha no ensaio de quantificação | Falha da curva padrão. | Repita a quantificação. Se a repetição falhar, contacte o Suporte Técnico da Illumina. | |
| Pooling failure (Falha no pooling) | Falha ao concluir o pooling de amostras | A análise do pooling não conseguiu calcular os volumes adequados de pool. | Avalie novamente a concentração de pool alvo. Repita a análise do pooling. | |

Resolução de problemas do VeriSeq NIPT Microlab STAR

| Passo do processo | Código de erro | Caixa de diálogo do erro | Descrição | Resolução por parte do utilizador |
|-------------------|----------------|---|--|---|
| Criação de lotes | EM0044 | The Batch ID entered contains forbidden characters. (O ID do lote introduzido contém caracteres proibidos). | O VeriSeq NIPT Solution v2 só aceita caracteres de números, letras, sublinhado e traços em todos os campos de dados. | Atribua um nome ao lote que não contenha caracteres especiais. |
| Criação de lotes | EM0051 | The Batch ID is greater than 36 characters in length. (O ID do lote é superior a 36 caracteres). | O VeriSeq NIPT Solution v2 limita o comprimento dos nomes de lote a 36 caracteres ou menos. | Atribua um nome ao lote com menos de 36 caracteres. |
| Criação de lotes | EM0076 | Unable to connect to VeriSeq Onsite Server v2 (Não foi possível ligar ao VeriSeq Onsite Server v2). | O VeriSeq Onsite Server v2 deixou de responder aos pedidos de dados do Workflow Manager (Gestor de fluxo de trabalho). | <ol style="list-style-type: none"> 1. Certifique-se de que o ML STAR está ligado à rede. 2. Certifique-se de que o VeriSeq Onsite Server v2 está ligado. 3. Verifique se é possível ligar o ML STAR ao VeriSeq Onsite Server v2 (através de pedido de ping). 4. Verifique o frasco de resíduos de vácuo. Se o frasco de resíduos está a mais de meio, esvazie-o. 5. Se os passos anteriores não resolverem o problema, contacte o Suporte Técnico da Illumina. |

| Passo do processo | Código de erro | Caixa de diálogo do erro | Descrição | Resolução por parte do utilizador |
|----------------------|----------------|--|---|---|
| Criação de lotes | EM0118 | This batch has been failed and cannot be further processed. (Este lote falhou e não pode ser processado). | O lote especificado já falhou e não pode ser processado. | O registo do lote no VeriSeq Onsite Server v2 indica que o lote selecionado falhou. Não são permitidos mais processamentos. Crie outro lote com as amostras requeridas. |
| Criação de lotes | Não aplicável | This batch has already completed processing. Would you like to repool? (Este lote já concluiu o processamento. Pretende repetir o pool?) | O lote indicado foi processado através de pooling. O único processamento permitido é a repetição do pool. | <p>Repita o pool conforme indicado em seguida.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Selecione Re-Pool (Repetir pool). • Interrompa o método e certifique-se de que o nome do lote está correto antes de repetir o pool. |
| Isolamento do plasma | WP0087 | Duplicate sample barcodes loaded. (Foram carregados códigos de barras de amostras duplicados). | Foram carregadas no sistema amostras com códigos de barras idênticos. | <ol style="list-style-type: none"> 1. Siga as instruções do Workflow Manager (Gestor de fluxo de trabalho) para identificar as amostras duplicadas. 2. Remova as amostras duplicadas e coloque uma nova etiqueta ou substitua as mesmas. 3. Volte a carregar as amostras. |
| Isolamento do plasma | EP0102 | Samples specified in the Sample Sheet were not loaded. (As amostras especificadas na ficha de amostras não foram carregadas). | As amostras incluídas na ficha de amostras não foram incluídas nos códigos de barras carregados. | <ol style="list-style-type: none"> 1. Siga as instruções do Workflow Manager (Gestor de fluxo de trabalho) para identificar as amostras em falta. 2. Faça uma das opções seguintes: <ul style="list-style-type: none"> • Adicione as amostras em falta ao lote e volte a carregar as amostras. • Interrompa o método e modifique a ficha de amostras conforme necessário. Reinicie o método. |

| Passo do processo | Código de erro | Caixa de diálogo do erro | Descrição | Resolução por parte do utilizador |
|--------------------------|-----------------------|--|--|---|
| Carregamento de placas | Não aplicável | Venus Barcode Mask Error. (Erro de máscara de código de barras Venus). | O Workflow Manager (Gestor de fluxo de trabalho) executa a associação correta placa -lote com as máscaras de código de barras Venus. | <ol style="list-style-type: none"> 1. Verifique a colocação da placa para confirmar que a disposição da placa está correta. 2. Certifique-se de que a placa carregada é a placa correta para o lote indicado. |
| Extração de cfDNA | WE0150 | Pressure in the vacuum chamber is too low. (A pressão na câmara de vácuo é demasiado baixa). | O Workflow Manager (Gestor de fluxo de trabalho) não continua se o sensor de pressão da linha de vácuo em repouso for < 400 Torr. | <ol style="list-style-type: none"> 1. Verifique se existem dobras ou outras obstruções na linha de vácuo. 2. Abra os grampos de desengate da linha de resíduos e, em seguida, deixe sair a pressão e feche totalmente os grampos de desengate da linha. 3. Certifique-se de que o controlador de vácuo e a bomba estão ligados. 4. Se o problema persistir, contacte o Suporte Técnico da Illumina. |
| Extração de cfDNA | WE0153 | Pressure in the vacuum chamber is too high. (A pressão na câmara de vácuo é demasiado alta). | Se a pressão de vácuo medida for demasiado alta antes do início do controlo de pressão, o sistema pode funcionar incorretamente. | Na parte de trás do controlador, certifique-se de que todas as ligações e linhas de vácuo estão fixas. |

| Passo do processo | Código de erro | Caixa de diálogo do erro | Descrição | Resolução por parte do utilizador |
|-------------------|----------------|---|---|--|
| Extração de cfDNA | WE0996 | Vacuum failed to seal. (Falha ao selar o vácuo). | A falha de selagem tem de ser resolvida antes de avançar. | Verifique se a falha de selagem está resolvida antes de selecionar OK . 1. Certifique-se de que a placa de ligação está nivelada com o tubo de vácuo. Utilize uma luva na mão para pressionar com força a placa de ligação para baixo. 2. Ouça o ruído do vácuo e observe o fluxo de água através da placa de ligação. 3. Abra a vista de traçado no Workflow Manager (Gestor de fluxo de trabalho). Depois de a leitura da pressão real atingir, no mínimo, menos 50 unidades de pressão em relação à leitura do ambiente, seleccione OK para continuar a extração de cfDNA. 4. Se a leitura de pressão exigida não for alcançada durante o tempo previsto, seleccione OK para continuar com a primeira carga de lisado. 5. Coloque o método em pausa depois de o lisado ser dispensado na placa de ligação. Volte a colocar e pressione com força a placa de ligação para baixo. 6. Se o lisado não fluir através da placa, contacte o Suporte Técnico da Illumina. |

| Passo do processo | Código de erro | Caixa de diálogo do erro | Descrição | Resolução por parte do utilizador |
|-------------------|----------------|---|---|--|
| Extração de cfDNA | WM0219 | If Vacuum is on, manually rest the pump. (Se o vácuo estiver ligado, coloque a bomba em repouso manualmente). | O vácuo pode ficar ligado após interromper um método durante a extração. | <ol style="list-style-type: none"> No controlador de vácuo, prima o botão Power (Alimentação) para desligar o vácuo. Aguarde 10 segundos e, em seguida, prima o botão Power (Alimentação) novamente para ligar o vácuo. |
| Extração de cfDNA | EE0477 | An error has occurred while moving a plate. (iSWAP error) (Ocorreu um erro ao mover uma placa [erro iSWAP]). | Se ocorrer um erro iSWAP (queda da placa, falha ao pegar, etc.), o sistema solicita-lhe que conclua o movimento da placa manualmente. | <p>Certifique-se de que é possível recuperar a placa (sem material derramado).</p> <ul style="list-style-type: none"> Se não for possível recuperar a placa, interrompa o ensaio. Se for possível recuperar a placa, siga as instruções apresentadas para concluir a transferência da placa manualmente. |
| Extração de cfDNA | EE0519 | Scanned barcode does not match Binding Plate barcode on record. (O código de barras lido não corresponde ao código de barras da placa de ligação no registo). | A placa de ligação carregada não corresponde ao código de barras da placa removida. | Certifique-se de que a placa carregada corresponde ao código de barras registado (consulte o registo de traçado do código de barras esperado). |

| Passo do processo | Código de erro | Caixa de diálogo do erro | Descrição | Resolução por parte do utilizador |
|-------------------|----------------|---|--|---|
| API | EA0372 | Unable to connect to the data server. (Não foi possível ligar ao servidor de dados). | O VeriSeq Onsite Server v2 deixou de responder aos pedidos de dados do Workflow Manager (Gestor de fluxo de trabalho). | <ol style="list-style-type: none"> 1. Certifique-se de que o ML STAR está ligado à rede. 2. Certifique-se de que o VeriSeq Onsite Server v2 está ligado. 3. Verifique se é possível ligar o ML STAR ao VeriSeq Onsite Server v2 (através de pedido de ping). |
| | EA0774 | Connection Error. The API server connection failed to validate. (Erro de ligação. A validação da ligação ao servidor API falhou). | O VeriSeq Onsite Server v2 deixou de responder aos pedidos de dados do Workflow Manager (Gestor de fluxo de trabalho). | <p>Certifique-se de que:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Certifique-se de que o ML STAR está ligado à rede. 2. Verifique que é possível ligar o ML STAR ao VeriSeq Onsite Server v2 (através de pedido de ping). 3. Certifique-se de que o VeriSeq Onsite Server v2 está ligado. |
| | EA0780 | 403: Invalid Request The current transaction is not valid. (403: Pedido inválido. A transação atual não é válida). | Os dados enviados violam a lógica do fluxo de dados do sistema. | Consulte os detalhes de erro para obter mais informações. As causas comuns envolvem dados demasiado longos ou violam a lista de caracteres aceitáveis. |

Referências

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.

Histórico de revisões

| Documento | Data | Descrição da alteração |
|------------------------------------|-------------------|---|
| Documento n.º 1000000078751 v08 | Agosto de 2022 | Atualização da referência do fluxo de trabalho Remoção da instrução de pipetar para misturar se a placa de biblioteca estivesse congelada. |
| Documento n.º 1000000078751 v07 | Maio de 2022 | <p>Separação das limitações do procedimento nos relatórios do VeriSeq NIPT Solution v2 e inclusão dos primeiros dois pontos. Texto restante numa nova secção Limitações do ensaio.</p> <p>Remoções</p> <ul style="list-style-type: none"> • VeriSeq de todos os rótulos de reagentes. • Aplicação de um código de barras de placa à VeriSeq NIPT Adapter Plate (Placa adaptadora NIPT VeriSeq) na preparação de bibliotecas. <p>Adições</p> <ul style="list-style-type: none"> • Palavra certificada a água sem RNase/DNase. • Um dos seguintes leitores de micropipetas ou equivalente e SpectraMax M2, M3, M4, M5 e nota. • À secção VeriSeq NIPT Microlab STAR para explicar o que fazer durante um evento de resolução de erro. • Uma nota para inspeção visual dos poços. • Instruções para os lotes de 24 e 48 amostras ao longo das secções de protocolo. • Instruções para a utilização da placa adaptadora roxa ou equivalente. • Declarações na secção de Dados demográficos e características da gestação para incluir resultados do primeiro trimestre da gravidez. • Um ponto nas especificações da placa de poços profundos para indicar que é resistente a torção. <p>Atualizações</p> |

| Documento | Data | Descrição da alteração |
|---------------------------------|------------------|---|
| | | <ul style="list-style-type: none"> • Declarações relativas aos nomes de lote exclusivos, para clareza, e indicação de exemplo. • Símbolos e formatação de frases de Nota, Atenção e Aviso. • Subpontos relativos a resultados de teste. • Tiocianato de guanidina para hipoclorito de guanidina. • CVS para BVS (Basic Vacuum System, sistema de vácuo básico) • Declarações relativas à utilização do rastreio genómico e da pontuação LLR. • Especificações: tubos de reagente, placas de poços profundos, placas de 384 poços, placas de 96 poços |
| Documento n.º 1000000078751 v06 | Agosto de 2021 | Foi atualizada a morada do Representante autorizado na UE. |
| Documento n.º 1000000078751 v05 | Dezembro de 2020 | <p>Atualização das secções Princípios do procedimento, Avisos e precauções e Etiquetas do produto com esclarecimentos adicionais de forma a cumprir os requisitos regulamentares. Pequenas atualizações no conteúdo do protocolo para corresponder ao estilo e organização atual da Illumina. Correção da descrição do cromossoma 21 de "o segundo autossoma humano mais pequeno" para "o autossoma humano mais pequeno" na secção Precisão do Desempenho analítico. Adição de declarações de atenção para abordar a utilização incorreta de reservatórios e riscos de junção de amostras nas secções de Preparação de plasma isolado e Interpretação dos resultados.</p> <p>Adição de novas referências de servidor e software para a publicação de um novo modelo de servidor e atualizações de referência de software.</p> <p>Adição de precauções ao protocolo e informações de resolução de problemas para abordar o impedimento de excessos de amostra.</p> <p>Atualização dos ingredientes ativos no reagente padrão de quantificação de ADN na Caixa de acessórios para estar de acordo com a ficha de dados de segurança.</p> <p>Atualização das convenções de atribuição de nomes do módulo VeriSeq NIPT do Local Run Manager para fins de consistência com outra documentação.</p> <p>Adição do histórico de revisões.</p> |

| Documento | Data | Descrição da alteração |
|------------------------------------|----------------------|---|
| Documento n.º 1000000078751 v04 | Outubro de 2020 | Pequenas correções. |
| Documento n.º 1000000078751 v03 | Setembro de 2020 | Atualização da lista de materiais para apresentar as especificações do material de laboratório em conjunto com as opções compatíveis conhecidas. |
| Documento n.º 1000000078751 v02 | Fevereiro de 2020 | Atualização da apresentação de informações relativas ao desempenho clínico, para transmitir de melhor forma as diferenças entre os tipos de rastreio básico e genómico. Adição da nova secção Diferenças no desempenho entre o rastreio básico e genómico. Remoção de informação contraditória sobre a opção do relatório complementar da secção Princípios do procedimento. Atualização da convenção de atribuição de nomes do software VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 ao longo do documento para consistência estilística. Atualização das etiquetas para os endereços da Austrália e Illumina Netherlands, para refletir as alterações recentes. |
| Documento n.º 1000000078751 v01 | Agosto de 2019 | Remoção do passo duplicado em Extração de cfDNA causado por um erro do software de publicação. |
| Documento n.º 1000000078751 v00 | Maio de 2019 | Edição inicial. |

Patentes e marcas comerciais

Este documento e respetivo conteúdo são propriedade da Illumina, Inc. e das suas afiliadas ("Illumina") e destinam-se unicamente a utilização contratual por parte dos clientes relativamente à utilização dos produtos descritos no presente documento e para nenhum outro fim. Este documento e respetivo conteúdo não podem ser utilizados ou distribuídos para qualquer outro fim e/ou de outra forma transmitidos, divulgados ou reproduzidos por qualquer via, seja de que natureza for, sem a autorização prévia por escrito da Illumina. A Illumina não concede qualquer licença ao abrigo da sua patente, marca comercial, direito de autor ou direitos de jurisprudência nem direitos semelhantes de quaisquer terceiros por via deste documento.

As instruções contidas neste documento têm de ser estrita e explicitamente seguidas por pessoal qualificado e com a devida formação para garantir a utilização adequada e segura dos produtos aqui descritos. Todo o conteúdo deste documento tem de ser integralmente lido e compreendido antes da utilização dos referidos produtos.

A NÃO OBSERVÂNCIA DA RECOMENDAÇÃO PARA LER INTEGRALMENTE E SEGUIR EXPLICITAMENTE TODAS AS INSTRUÇÕES AQUI CONTIDAS PODE RESULTAR EM DANOS NOS PRODUTOS, LESÕES EM PESSOAS, INCLUINDO NOS UTILIZADORES OU OUTROS, E EM DANOS MATERIAIS, E IRÁ ANULAR QUALQUER GARANTIA APLICÁVEL AOS PRODUTOS.

A ILLUMINA NÃO ASSUME QUALQUER RESPONSABILIDADE RESULTANTE DA UTILIZAÇÃO INADEQUADA DOS PRODUTOS AQUI DESCRITOS (INCLUINDO PARTES DOS MESMOS OU DO SOFTWARE).

© 2022 Illumina, Inc. Todos os direitos reservados.

Todas as marcas comerciais são propriedade da Illumina, Inc. ou dos respetivos proprietários. Para informações específicas sobre marcas comerciais, consulte www.illumina.com/company/legal.html.

Informações de contacto



Illumina

5200 Illumina Way

San Diego, Califórnia 92122 EUA

+1 800 809 ILMN (4566)

+1 858 202 4566 (fora da América do Norte)

techsupport@illumina.com

www.illumina.com



Illumina Netherlands B.V.

Steenoven 19

5626 DK Eindhoven

Países Baixos

Promotor australiano

Illumina Australia Pty Ltd

Nursing Association Building

Level 3, 535 Elizabeth Street

Melbourne, VIC 3000

Austrália

Etiquetas do produto

Para uma referência completa de símbolos que constam da embalagem e das etiquetas do produto, consulte a chave de símbolos em support.illumina.com, no separador *Documentation* (Documentação) do seu kit.

Pode encontrar um Resumo de segurança e desempenho (SSP, Summary of Safety and Performance) em <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>, após o lançamento da base de dados europeia para os dispositivos médicos (Eudamed). Este está associado ao UDI-DI básico (0081627002NIPTRP).