

## Instrucciones de uso

PARA USO DIAGNÓSTICO *IN VITRO*.

## Uso previsto

VeriSeq™ NIPT Solution v2 es una prueba diagnóstica *in vitro* concebida para su uso como prueba de cribado para la detección de anomalías genéticas fetales del genoma completo a partir de muestras de sangre completa periférica materna de mujeres embarazadas de un mínimo de 10 semanas de gestación. VeriSeq NIPT Solution v2 usa la secuenciación del genoma completo para detectar duplicaciones y deleciones parciales de todos los autosomas, así como el estado de aneuploidía de todos los cromosomas. La prueba ofrece la opción de solicitar un informe sobre aneuploidía de cromosomas sexuales (SCA, Sex Chromosome Aneuploidy). Este producto no debe usarse como la única base para el diagnóstico ni para la toma de decisiones en relación con el embarazo.

VeriSeq NIPT Solution v2 incluye: VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 para VeriSeq NIPT Microlab STAR, VeriSeq NIPT Sample Prep Kit y VeriSeq Onsite Server v2 con VeriSeq NIPT Assay Software v2. VeriSeq NIPT Solution v2 se ha concebido para su uso con un secuenciador de nueva generación.

## Resumen y explicación del ensayo

Las anomalías cromosómicas, específicamente la aneuploidía (un número anormal de cromosomas), son una causa habitual de incapacidad reproductiva, anomalías congénitas, retraso en el desarrollo y discapacidad intelectual. La aneuploidía afecta aproximadamente a 1 de cada 300 nacidos vivos, y la tasa de aborto o muerte fetal es mucho más elevada.<sup>1,2</sup> Hasta hace muy poco, había dos tipos de pruebas prenatales para estos trastornos: pruebas diagnósticas o cribados. Las pruebas diagnósticas llevan aparejados procedimientos invasivos como la amniocentesis o la biopsia de vellosidades coriónicas. Estos métodos se consideran los métodos de referencia para la detección de la aneuploidía fetal. Sin embargo, están asociados con un riesgo de pérdida del embarazo de entre el 0,11 % y el 0,22 %.<sup>3</sup> Las pruebas de detección de marcadores múltiples no conllevan riesgo de pérdida del embarazo, ya que no son invasivas, con unas tasas de detección de trisomía del 21 que oscilan entre el 69 % y el 96 %, en función de la detección concreta, la edad de la madre y el tiempo de gestación en el momento de la prueba.<sup>4</sup> Lo importante es que la tasa de falsos positivos es de un 5 % aproximadamente, por lo que puede necesitarse una confirmación mediante pruebas diagnósticas, que, como se ha mencionado, conllevan un riesgo de pérdida del embarazo.<sup>4</sup> Los cribados mediante ecografía también pueden detectar anomalías cromosómicas, pero su grado de precisión es aún menor que el de los otros métodos mencionados.

La aneuploidía fetal de los cromosomas 21, 18, 13, X e Y se puede detectar con un alto grado de precisión mediante una prueba prenatal no invasiva (NIPT) con secuenciación del genoma completo del ADN fetal libre circulante (ADNflic) obtenido del plasma materno a partir de la décima semana de gestación. De un metaanálisis más reciente que comprende varios estudios clínicos se desprenden las siguientes tasas de detección y especificidades agrupadas y ponderadas para la trisomía del 21 y la trisomía del 18 en embarazos

con un único embrión: para la trisomía del 21, 99,7 % y 99,96 % y para la trisomía del 18, 97,9 % y 99,96 %, respectivamente.<sup>5</sup> En un estudio se sugiere que el uso de NIPT como herramienta de detección principal en todos los embarazos podría reducir un 89 % el número de procedimientos invasivos de confirmación.<sup>6</sup>

La reducción significativa de las tasas de falsos positivos de las NIPT, en comparación con el cribado de marcadores múltiples convencional, ha llevado a numerosas organizaciones de profesionales sanitarios a publicar comunicados en los que muestran su apoyo al uso de las NIPT.

En concreto, la International Society for Prenatal Diagnosis (ISPD), el American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG)/Society for Maternal Fetal Medicine (SMFM), el American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) y la European Society of Human Genetics/American Society of Human Genetics se muestran a favor de que se ofrezcan NIPT a todas las mujeres embarazadas.<sup>7,8,9</sup> Se recomienda ofrecer asesoramiento antes de la prueba, incluir un consentimiento informado y una prueba diagnóstica para confirmar un resultado positivo de la detección de ADN fetal libre circulante.<sup>4</sup>

VeriSeq NIPT Solution v2 es una prueba de diagnóstico *in vitro* (DIV) no invasiva que utiliza secuenciación del genoma completo de fragmentos de ADN fetal libre circulante procedentes de muestras de sangre completa periférica materna a partir de la décima semana de gestación. La prueba ofrece dos opciones para tipos de cribado: básico y genoma completo. El cribado básico proporciona información sobre la presencia de aneuploidías de los cromosomas 21, 18, 13, X e Y. Los cribados del genoma completo proporcionan información sobre la presencia de duplicaciones y deleciones parciales para todos los autosomas, así como de aneuploidías de todos los cromosomas. Ambos tipos de cribado ofrecen la opción de informar sobre aneuploidía del cromosoma sexual (SCA), con posibilidad de informar o no sobre el sexo del feto. Es posible desactivar la opción de informar sobre SCA. Si se desactiva la opción de informar sobre SCA, tampoco se informará sobre el sexo del feto. Para obtener más información sobre las opciones para informar sobre el sexo, consulte la *VeriSeq NIPT Solution v2 Software Guide (Guía de software de VeriSeq NIPT Solution v2)* (n.º de documento 1000000067940).

## Principios del procedimiento

VeriSeq NIPT Solution v2 es una solución automatizada para pruebas de NIPT en laboratorio, que consiste en la preparación de muestras y en el análisis de datos de secuenciación. VeriSeq NIPT Sample Prep Kit consta de reactivos especializados de un solo uso que se usan junto con VeriSeq NIPT Microlab STAR para preparar lotes de 24, 48 o 96 muestras para la secuenciación de nueva generación. Los datos de secuenciación «paired-end» del genoma completo se analizan mediante software especializado, VeriSeq NIPT Assay Software v2, y se genera un informe que proporciona resultados cualitativos.

El flujo de trabajo consta de los procedimientos siguientes: recogida de muestras, aislamiento del plasma, extracción de ADN fetal libre circulante, preparación de librerías, cuantificación de librerías, agrupación de librerías, secuenciación y análisis. A continuación, se describe con más detalle cada uno de los procedimientos:

- **Recogida de muestras:** de 7 ml a 10 ml de sangre completa periférica materna en un tubo de recogida de sangre (BCT) Streck para ADN sin células, que evita la lisis celular y la contaminación genómica, además de estabilizar la sangre completa.

- **Aislamiento del plasma:** el plasma se aísla de la sangre completa periférica materna durante 5 días contados a partir de la recogida. Este aislamiento se logra mediante técnicas de centrifugado estándar. VeriSeq NIPT Microlab STAR aspira y dispensa el plasma en una placa de 96 pocillos profundos para el procesamiento siguiente. En caso de que sea necesario volver a realizar las pruebas, las muestras posprocesamiento pueden volver a taparse y almacenarse a 4 °C durante un periodo de 5 días más (hasta un total de 10 días desde la recogida de la sangre).

**PRECAUCIÓN**

Superar los tiempos de almacenamiento indicados puede afectar de manera negativa a las tasas de error de las muestras individuales.

- **Extracción de ADN fetal libre circulante:** la purificación del ADN fetal libre circulante a partir de plasma se logra mediante la adsorción en una placa de unión, el lavado de la placa de unión para eliminar los contaminantes y la elución.
- **Preparación de librerías:** los fragmentos purificados de ADN fetal libre circulante se someten a un proceso de reparación para convertir los 5' y 3' protuberantes en extremos romos. A continuación, se añade un nucleótido de desoxiadenosina a los extremos 3' para crear un protuberante de base individual. Los adaptadores indexados que contienen un 3' protuberante de desoxitimidina de base sencilla se ligan entonces a los fragmentos de ADN fetal libre circulante procesados. El ADN ligado se purifica mediante bolas de inmovilización inversa de fase sólida. Cada muestra de un conjunto de 24, 48 o 96 recibe un adaptador indexado único. Los adaptadores cumplen dos funciones:

**PRECAUCIÓN**

Extreme las precauciones para evitar la contaminación cruzada de los índices, que podría ocasionar resultados incorrectos.

- Los índices permiten la identificación de muestras en la secuenciación siguiente.
- Los adaptadores de índices contienen secuencias que permiten capturar librerías en la superficie sólida de una celda de flujo de secuenciación para la generación de grupos y la posterior secuenciación.
- **Cuantificación:** el producto de la librería se cuantifica mediante un colorante fluorescente cuya concentración viene dada por la comparación con una curva estándar de ADN.
- **Secuenciación y agrupamiento de librerías:** las librerías de muestras se agrupan en grupos de 24 o 48 muestras en cantidades que se ajustan para minimizar la variación de la cobertura. Cada grupo se secuencia luego mediante un secuenciador de nueva generación.
- VeriSeq NIPT Solution v2 no incluye el equipo de secuenciación ni los consumibles.
- **Análisis.** Para cada muestra, el análisis consiste en lo siguiente:
  - Identificación de los fragmentos de la librería según secuencia de índice y alineación de las lecturas «paired-end» con un genoma humano de referencia.
  - Estimación de la fracción fetal de la librería combinando la información de distribución de la longitud y de las coordenadas genéticas de los fragmentos de la librería.

- Tras descartar las tendencias conocidas, un modelo estadístico detecta las regiones del genoma que están sobrerrepresentadas o infrarrepresentadas en la librería de una forma compatible con una anomalía en el nivel estimado de fracción fetal.
- El informe NIPT ofrece los resultados resumidos del menú de prueba seleccionado en los que se indica ANOMALY DETECTED (ANOMALÍA DETECTADA) o NO ANOMALY DETECTED (ANOMALÍA NO DETECTADA) junto con una estimación de la fracción fetal para las muestras que superan el CC.
- El informe complementario proporciona criterios de medición cuantitativos que caracterizan cada anomalía detectada.

## Limitaciones del procedimiento

### Limitaciones del ensayo

- Las pruebas relativas a la sensibilidad y especificidad de la prueba cubren tanto embarazos de un único embrión como gemelares. Estas instrucciones de uso no proporcionan datos de sensibilidad ni especificidad para embarazos de trillizos o embarazos múltiples de orden superior.
- VeriSeq NIPT Solution v2 no está diseñada para la detección de poliploidías, tales como triploidías.
- VeriSeq NIPT Solution v2 no está diseñada para la detección de reordenamientos cromosómicos equilibrados.
- Para el ensayo hacen falta muestras de sangre completa periférica materna de mujeres embarazadas de un mínimo de 10 semanas de gestación.
- En el caso de cribados básicos, la prueba de VeriSeq NIPT Solution v2 busca anomalías cromosómicas específicas. Los informes con el resultado NO ANOMALY DETECTED (NO SE HAN DETECTADO ANOMALÍAS) no eliminan la posibilidad de que existan anomalías cromosómicas de los cromosomas analizados. Un resultado negativo tampoco elimina la posibilidad de que el embarazo presente otras anomalías cromosómicas, afecciones genéticas o anomalías congénitas (por ejemplo, anomalía de tubo neural abierto).
- En el caso de cribados del genoma completo, las deleciones y duplicaciones grandes que son inferiores al 75 % del tamaño del cromosoma pueden indicar aneuploidía del cromosoma completo.
- En el caso de cribados del genoma completo, determinadas regiones quedan excluidas del análisis. En el sitio web de asistencia de Illumina, encontrará una lista de dichas regiones excluidas. La detección de anomalías genómicas solo se realiza en las regiones que no están excluidas.
- La generación de informes sobre el sexo del feto no está disponible en todas las regiones, debido a las normativas locales aplicables a la generación de informes sobre el género del feto.
- Según los datos clínicos de la bibliografía, los resultados del cribado basado en ADN fetal libre circulante pueden verse alterados por determinados factores maternos y fetales. A continuación, se enumeran algunos de estos factores, aunque no se limitan a los siguientes:
  - Transfusión de sangre materna reciente

- Trasplante de órgano/trasplante de células madre previo materno
- Enfermedad autoinmunitaria materna
- Neoplasias maternas (benignas y malignas)
- Mosaicismo materno
- Variaciones en el número de copias maternas
- Mosaicismo fetoplacentario/mosaicismo confinado a la placenta
- Pérdida del feto/reabsorción fetal

## Generación de informes de VeriSeq NIPT Solution v2

- VeriSeq NIPT Solution v2 es una prueba de cribado y no debe usarse sin recurrir también a otros hallazgos clínicos y resultados de pruebas. Las conclusiones sobre las posibles dolencias que afecten al feto y la toma de decisiones en relación con el embarazo no deben basarse solo en los resultados del cribado NIPT.<sup>7</sup>
- VeriSeq NIPT Solution v2 informa sobre los siguientes aspectos:
  - El cribado básico analiza si existe o no sobrerrepresentación de los cromosomas 13, 18 y 21.
  - El cribado del genoma completo evalúa si existe o no infrarrepresentación o sobrerrepresentación de todos los autosomas, incluidas las deleciones y duplicaciones parciales de como mínimo 7 Mb.
  - En el caso de embarazos de un único embrión en los que se haya seleccionado Yes (Sí) o SCA como opción de generación de informes sobre sexo, también analiza si existen o no las siguientes anomalías de cromosomas sexuales: XO, XXX, XXY y XYY.
  - En el caso de embarazos de un único embrión en los que se haya seleccionado Yes (Sí) como opción de generación de informes sobre sexo, se informa también sobre el sexo del feto.
  - La presencia o ausencia de un cromosoma Y en embarazos gemelares.

## Componentes del producto

VeriSeq NIPT Solution v2 consta de lo siguientes kits de preparación de muestras:

- VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (24 samples) (n.º de referencia 20025895)
- VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (48 samples) (n.º de referencia 15066801)
- VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (96 samples) (n.º de referencia 15066802)

VeriSeq NIPT Solution v2 consta de lo siguientes componentes de software:

- VeriSeq NIPT Assay Software v2 (n.º de referencia 20047024), preinstalado en VeriSeq Onsite Server v2.
  - VeriSeq Onsite Server v2 (n.º de referencia 20028403, 20047000 o 20101927) o VeriSeq Onsite Server actual (n.º de referencia 15076164 o 20016240) actualizado a v2.
- VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 (n.º de referencia 20044988), preinstalado en VeriSeq NIPT Microlab STAR.

- VeriSeq NIPT Microlab STAR (n.º de referencia Hamilton Company Reno: 95475-01 [115 V] y 95475-02 [230 V], Hamilton Company Bonaduz: 806288)
- Módulo VeriSeq NIPT de Local Run Manager (n.º de referencia 20044989)

## Reactivos

### Reactivos suministrados

Illumina suministra los reactivos siguientes: VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (24 samples) (n.º de referencia 20025895), VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (48 samples) (n.º de referencia 15066801), y VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (96 samples) (n.º de referencia 15066802). VeriSeq NIPT Sample Prep Kit está configurado para su uso con VeriSeq NIPT Microlab STAR (ML STAR) (n.º de referencia 95475-01, 95475-02 u 806288), suministrado por Hamilton Company.

#### VeriSeq NIPT Sample Prep Kit, Extraction Box

Tabla 1 VeriSeq NIPT Extraction Box (24) y (48), n.º de referencia 20025869 y 15066803

Nombre del reactivo en la etiqueta	Número de contenedores en el kit	Principios activos	Almacenamiento
Tampón de lisis	1	Clorhidrato de guanidina en solución acuosa tamponada	Entre 15 °C y 30 °C
Tampón de lavado I	1	Clorhidrato de guanidina y 2-propanol en solución acuosa tamponada	Entre 15 °C y 30 °C
Tampón de lavado II	1	Solución acuosa tamponada con sales.	Entre 15 °C y 30 °C
Tampón de elución	1	Solución acuosa tamponada	Entre 15 °C y 30 °C
Tampón de proteinasa	1	Glicerol en solución acuosa tamponada	Entre 15 °C y 30 °C
Proteinasa K	3	Proteinasa K liofilizada	Entre 15 °C y 30 °C

Tabla 2 VeriSeq NIPT Extraction Box (96), n.º de referencia 15066807

Nombre del reactivo en la etiqueta	Número de contenedores en el kit	Principios activos	Almacenamiento
Tampón de lisis	1	Clorhidrato de guanidina en solución acuosa tamponada	Entre 15 °C y 30 °C
Tampón de lavado I	1	Clorhidrato de guanidina y 2-propanol en solución acuosa tamponada	Entre 15 °C y 30 °C
Tampón de lavado II	2	Solución acuosa tamponada con sales.	Entre 15 °C y 30 °C
Tampón de elución	1	Solución acuosa tamponada	Entre 15 °C y 30 °C
Tampón de proteinasa	1	Glicerol en solución acuosa tamponada	Entre 15 °C y 30 °C
Proteinasa K	4	Proteinasa K liofilizada	Entre 15 °C y 30 °C

### VeriSeq NIPT Sample Prep Kit, Library Prep Box

Tabla 3 VeriSeq NIPT Library Prep Box (24) y (48), n.º de referencia 20026030 y 15066809

Nombre del reactivo en la etiqueta	Número de contenedores en el kit	Principios activos	Almacenamiento
Mezcla de reparación de extremos	1	ADN-polimerasa y dNTP en solución acuosa tamponada	Entre -25 °C y -15 °C
Mezcla de adición de cola de A	1	ADN-polimerasa y dATP en solución acuosa tamponada	Entre -25 °C y -15 °C
Mezcla de ligadura	1	ADN-ligasa en solución acuosa tamponada	Entre -25 °C y -15 °C
Tampón de hibridación	1	Solución acuosa tamponada	Entre -25 °C y -15 °C
Placa adaptadora de ADN NIPT	1	Oligonucleótidos en solución acuosa tamponada	Entre -25 °C y -15 °C

Tabla 4 VeriSeq NIPT Library Prep Box (96), n.º de referencia 15066810

Nombre del reactivo en la etiqueta	Número de contenedores en el kit	Principios activos	Almacenamiento
Mezcla de reparación de extremos	1	ADN-polimerasa y dNTP en solución acuosa tamponada	Entre -25 °C y -15 °C
Mezcla de adición de cola de A	2	ADN-polimerasa y dATP en solución acuosa tamponada	Entre -25 °C y -15 °C
Mezcla de ligadura	2	ADN-ligasa en solución acuosa tamponada	Entre -25 °C y -15 °C
Tampón de hibridación	1	Solución acuosa tamponada	Entre -25 °C y -15 °C
Placa adaptadora de ADN NIPT	1	Oligonucleótidos en solución acuosa tamponada	Entre -25 °C y -15 °C

### VeriSeq NIPT Sample Prep Kit, Accessory Box

Tabla 5 VeriSeq NIPT Accessory Box, n.º de referencia 15066811

Nombre del reactivo en la etiqueta	Número de contenedores en el kit	Principios activos	Almacenamiento
Placa de unión de ADN	1	Microplaca de polipropileno con membrana de silicona modificada	Entre 2 °C y 8 °C
Tampón de resuspensión	1	Solución acuosa tamponada	Entre 2 °C y 8 °C
Bolas de purificación de muestras	1	Bolas paramagnéticas de fase sólida en solución acuosa tamponada	Entre 2 °C y 8 °C
Reactivo de cuantificación de ADN	1	Colorante intercalado para ADN en DMSO	Entre 2 °C y 8 °C
Estándar de cuantificación de ADN	1	ADN bicatenario estándar, ADN no específico y azida sódica en solución acuosa tamponada	Entre 2 °C y 8 °C

## VeriSeq NIPT Sample Prep Kit, Workflow Tubes and Labels

Tabla 6 Workflow Tubes and Labels, n.º de referencia 15071543

Nombre del artículo en la etiqueta	Número de artículos en el kit	Almacenamiento
Etiqueta (LBL): código de barras de placa	9	Entre 15 °C y 30 °C
Etiqueta (LBL): código de barras de placa de pocillos profundos	12	Entre 15 °C y 30 °C
Tubo (TB): tubo de agrupación vacío	5	Entre 15 °C y 30 °C

## Reactivos no suministrados

### Reactivos necesarios no suministrados

- Reactivos de secuenciación y consumibles necesarios para el sistema de secuenciación de nueva generación (NGS, next-generation sequencing)
- Agua sin ARNasa ni DNasa de biología molecular
- Etanol, 100 % (etanol puro) de biología molecular

**NOTA** El uso de un etanol que no sea de biología molecular puede afectar de manera negativa el rendimiento del ensayo.

### Reactivos opcionales, no suministrados

- Solución salina tampón fosfato Dulbecco (DPBS) para control sin cadena molde (NTC)

# Conservación y manipulación

1. La temperatura ambiente se define como la temperatura que varía entre 15 °C y 30 °C.
2. Todos los reactivos son de un solo uso. Una vez preparados los reactivos para el uso, deben usarse de inmediato.
3. Si el embalaje o el contenido de los componentes de VeriSeq NIPT Solution resultan dañados o afectados, póngase en contacto con el servicio de atención al cliente de Illumina.
4. Los reactivos son estables si se conservan siguiendo las indicaciones hasta la fecha de caducidad especificada en las etiquetas de los kits. Consulte la columna «Almacenamiento» en las tablas en la sección [Reactivos](#) para obtener más información sobre las condiciones de almacenamiento. No utilice reactivos caducados.
5. Los cambios en el aspecto físico de los reactivos proporcionados son indicios del deterioro de los materiales. Si se producen cambios en el aspecto físico (p. ej., cambios evidentes en el color del reactivo o un aspecto turbio con contaminación microbiana), no utilice los reactivos.
6. Siga estas prácticas recomendadas para la manipulación de bolas de purificación de muestras:
  - No congele nunca las bolas.
  - Deje que las bolas alcancen la temperatura ambiente antes de usarlas.
  - Justo antes del uso, agite en vórtice las bolas hasta que queden bien suspendidas y el color tenga un aspecto homogéneo.
7. El tampón de lisis, el tampón de lavado I, el tampón de lavado II, el tampón de elución y el tampón de proteinasa pueden formar precipitados o cristales visibles. Antes del uso, agite enérgicamente en un mezclador vorticial y, a continuación, inspeccione visualmente para asegurarse de que no haya precipitados.
8. No congele nunca la sangre completa después de la recogida.
9. Secuencie las librerías lo antes posible tras la agrupación. Las librerías agrupadas son estables durante hasta 7 días a una temperatura comprendida entre -25 °C y -15 °C. No hace falta más desnaturalización si se almacenan con las condiciones de tiempo y temperatura descritas.

# Equipo y materiales

## Equipo y materiales necesarios, no suministrados

### Equipo necesario, no suministrado

Equipo	Proveedor
<p>Un sistema de secuenciación de nueva generación (NGS, Next-Generation Sequencing) con las siguientes capacidades:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Secuenciación «paired-end» de 2 × 36 pb</li> <li>• Compatibilidad con los adaptadores indexados dobles de VeriSeq NIPT Sample Prep Kit</li> <li>• Producción automática de archivos BCL</li> <li>• Química de dos canales</li> <li>• 400 millones de lecturas «paired-end» por experimento</li> <li>• Compatibilidad con VeriSeq NIPT Assay Software v2 o NextSeq 550Dx Sequencing System.</li> </ul>	Proveedor del instrumento o Illumina, n.º de referencia 20005715
Congelador, entre -25 °C y -15 °C	Proveedor de laboratorio general
Microcentrífuga	Proveedor de laboratorio general
Pipeteador	Proveedor de laboratorio general
Refrigerador, entre 2 °C y 8 °C	Proveedor de laboratorio general
Pipetas de un solo-canal de 20 µl	Proveedor de laboratorio general
Pipetas de un solo-canal de 200 µl	Proveedor de laboratorio general
Pipetas de un solo-canal de 1000 µl	Proveedor de laboratorio general
Mezclador vorticial	Proveedor de laboratorio general
<p>Conjunto de centrífuga y rotor para tubos de recogida de sangre</p> <p>Equivalente:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Centrifugadora refrigerada con capacidad para 1600 × g sin opción de freno</li> <li>• Rotor de contenedores móvil con contenedores</li> <li>• Accesorios para inserción de contenedores con una profundidad mínima de 76 mm</li> <li>• Adaptadores de inserción que admiten tubos de recogida de sangre de 16 mm x 100 mm</li> </ul>	Proveedor de laboratorio general

Equipo	Proveedor
<p>Recomendado:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Centrifugadora de la serie Allegra X12R, 1600 g</li> <li>Rotor de la centrifugadora Allegra GH-3.8 con contenedores</li> <li>Cubiertas de los contenedores de la centrifugadora Allegra, conjunto de dos</li> <li>Conjunto de adaptador de la centrifugadora Allegra, 16 mm, conjunto de cuatro</li> </ul>	<p>Beckman Coulter, n.º de artículo 392304 (120 V o 230 V)</p> <p>Beckman Coulter, n.º de artículo 369704</p> <p>Beckman Coulter, n.º de artículo 392805</p> <p>Beckman Coulter, n.º de artículo 359150</p>
<b>Conjunto de centrifugadora y rotor para microplacas</b>	
<p>Equivalente:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Centrifugadora con capacidad para 5600 × g</li> <li>Rotor de placa móvil con portaplacas de 96 pocillos, profundidad mínima de 76,5 mm.</li> <li>Multifuge X4 Pro-MD 120 V TX-1000BT</li> <li>Centrifugadora Sorvall Legend XTR</li> </ul>	<p>Proveedor de laboratorio general</p>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Rotor de microplacas HIGHPlate™ 6000</li> <li>Rotor HIGHPlate™ 6000</li> </ul> <p>Base de apoyo para microplacas</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Recomendado: <ul style="list-style-type: none"> <li>Base de apoyo MicroAmp para 96-pocillos</li> <li>Portaplacas de PCR de 96-pocillos</li> </ul> </li> </ul>	<p>Thermo Fisher Scientific, n.º 75016034</p> <p>Thermo Fisher Scientific, n.º de catálogo 75004521 (120 V) o n.º de catálogo 75004520 (230 V)</p> <p>Thermo Fisher Scientific, n.º de catálogo 75003606</p> <p>Thermo Scientific VWR, n.º de catálogo 97040-244</p> <p>Thermo Fisher Scientific, n.º de catálogo 4379590</p> <p>Thermo Fisher Scientific, n.º de catálogo AB-0563/1000</p>
<p>Uno de los siguientes lectores de microplacas o equivalente, (fluorímetro) con SoftMax Pro v6.2.2–7.1.2:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Gemini XPS</li> <li>SpectraMax M2, M3, M4 y M5. <ul style="list-style-type: none"> <li>El accesorio violeta se necesita con el lector de microplacas para su uso en el flujo de trabajo.</li> </ul> </li> </ul>	<p>Molecular Devices, n.º de referencia XPS</p> <p>Molecular Devices, n.º de referencia M2, M3, M4 y M5</p>
<p>Adaptador USB en serie de alta velocidad SpectraMax</p>	<p>Molecular Devices, n.º de referencia 9000-0938</p>

Equipo	Proveedor
Ciclador térmico con las especificaciones siguientes: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tapa calefactada</li> <li>• Intervalo de temperatura de 4 °C a 98 °C</li> <li>• Precisión de temperatura de <math>\pm 2</math> °C</li> <li>• Tasa de incremento mínima de 2 °C por segundo</li> <li>• Compatibilidad con placa Twin.tec PCR de 96-pocillos, de borde completo</li> </ul>	Proveedor de laboratorio general
VeriSeq NIPT Microlab STAR	Hamilton, n.º de referencia 95475-01 (115 V), n.º de referencia 95475-02 (230 V) o n.º de referencia 806288 (para Hamilton Company Bonaduz)
VeriSeq Onsite Server v2 o una versión actualizada de VeriSeq Onsite Server	Illumina, n.º de referencia 20028403 o 20047000 (v2) o 20101927 o n.º de referencia 15076164 o n.º de referencia 20016240 (actualizado)
Si usa NextSeq 550Dx Sequencing System: <ul style="list-style-type: none"> <li>• NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5, 75 cycles</li> </ul>	Illumina, n.º de referencia 20028870

### Equipo opcional, no suministrado

Equipo	Proveedor
Sistema decapsulador Pluggo	LGP Consulting, n.º de referencia 4600 4450
Placa de validación de fluorescencia SpectraMax SpectraTest FL1	Molecular Devices, n.º de referencia 0200-5060
Girador/rotador de tubos, tubos de 15 ml, 40 rpm, 100-240 V	Thermo Scientific, n.º de catálogo 88881001 (EE. UU.) o n.º de catálogo 88881002 (UE)

### Materiales necesarios, no suministrados

Consumible	Proveedor
Puntas de filtros no estériles, conductoras, 1000 $\mu$ l	Hamilton, n.º de referencia 235905
Puntas de filtros no estériles, conductoras, 300 $\mu$ l	Hamilton, n.º de referencia 235903
Puntas de filtros no estériles, conductoras, 50 $\mu$ l	Hamilton, n.º de referencia 235948

Consumible	Proveedor
<p>Depósito de pocillos profundos con las siguientes especificaciones:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Formato de microplaca SLAS 1-2004 con 96 pocillos de base piramidal o cónica y una capacidad mínima de 240 ml.</li> <li>• Polipropileno, preferiblemente de unión baja al ADN para todas las superficies de contacto con la muestra.</li> <li>• Las dimensiones internas (nivel de líquido) son compatibles con los pasos automatizados de aspiración y dispensación de VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> <li>• Las dimensiones de altura son compatibles con los movimientos automatizados de VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> </ul>	<p>Proveedor de laboratorio general</p> <p>Depósitos compatibles:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Corning Axygen, n.º de producto RES-SW96-HP-SI</li> <li>• Agilent, n.º de producto 201246-100</li> </ul>
<p>Cubeta de reactivo con las siguientes especificaciones:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Cubeta que encaja de forma segura, pero no forzada, en el portador de VeriSeq NIPT Microlab STAR, con fondo cónico y una capacidad mínima de 20 ml.</li> <li>• Polipropileno sin ARNasa/ADNasa.</li> <li>• Las dimensiones internas del depósito (nivel de líquido) generan niveles de líquido con volúmenes de reactivo de ensayo que son compatibles con los pasos de aspirado y dispensación automatizados de VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> <li>• Las dimensiones de altura son compatibles con los movimientos automatizados de VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> </ul>	<p>Cubetas compatibles:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Illumina Reagent Tub, n.º de referencia 20095418</li> </ul>

Consumible	Proveedor
<p>Placas de pocillos profundos con las siguientes especificaciones:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Formato de microplaca SLAS 1-2004, 3-2004 y 4-2004 con 96 pocillos de fondo piramidal o cónico y una capacidad mínima de los pocillos de 2 ml.</li> <li>• Polipropileno translúcido, preferiblemente de unión baja al ADN para todas las superficies de contacto con la muestra.</li> <li>• Las dimensiones del pocillo generan un nivel de líquido compatible con los pasos de aspiración y dispensación automatizados de VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> <li>• Borde de placa que permite colocar los códigos de barras de las placas en la posición necesaria con adherencia segura a una superficie plana.</li> <li>• Marco resistente a la torsión capaz de soportar un mínimo de 5600 × g.</li> <li>• Las dimensiones de altura de la placa son compatibles con los movimientos automatizados de VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> </ul>	<p>Proveedor de laboratorio general</p> <p>Placas compatibles:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Eppendorf, n.º de referencia 0030505301</li> <li>• Eppendorf, n.º de referencia 30502302</li> <li>• USA Scientific, n.º de referencia 1896-2000</li> </ul>
<p>Placas de 384 pocillos con las siguientes especificaciones:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Microplaca con 384 pocillos, optimizados para volúmenes bajos, con una capacidad mínima de los pocillos de 50 µl.</li> <li>• Poliestireno negro opaco con bloqueo de luz y de unión baja al ADN para todas las superficies de contacto con la muestra.</li> <li>• Las dimensiones de los pocillos generan niveles de líquidos que son compatibles con los pasos de aspiración y dispensación automatizados de VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> <li>• Las dimensiones de altura de la placa son compatibles con los movimientos automatizados de VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> <li>• Borde de placa que permite colocar los códigos de barras de las placas en la posición necesaria con adherencia segura a una superficie plana.</li> </ul>	<p>Proveedor de laboratorio general</p> <p>Placas compatibles:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Corning, n.º de producto 3820</li> </ul>

Consumible	Proveedor
<p>Placas de 96 pocillos con las siguientes especificaciones:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Microplaca con marco resistente a la torsión capaz de soportar un mínimo de 5600 × g y 96 pocillos translúcidos con fondo cónico, bordes elevados y una capacidad mínima de los pocillos de 150 µl.</li> <li>• Polipropileno sin ARNasa/ADNasa y de unión baja al ADN para todas las superficies de contacto con la muestra.</li> <li>• Las dimensiones de los pocillos generan niveles de líquidos que son compatibles con los pasos de aspiración y dispensación automatizados de VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> <li>• Las dimensiones de altura de la placa son compatibles con los movimientos automatizados de VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> </ul> <p><b>NOTA:</b> Es posible que los materiales de plástico compatibles con números de pieza diferentes, por ejemplo, placas de 96 pocillos compatibles de distintos fabricantes, no puedan intercambiarse directamente sin una calibración específica de la pieza del sistema VeriSeq NIPT Microlab STAR por parte del personal de servicio y asistencia de Illumina. Si desea realizar un cambio entre los diferentes materiales de plástico, consulte a su equipo de asistencia de Illumina.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Borde de placa que permite colocar los códigos de barras de las placas en la posición necesaria con adherencia segura a una superficie plana.</li> <li>• Compatible con termocicladores para la desnaturalización.</li> </ul>	<p>Proveedor de laboratorio general</p> <p>Placas compatibles:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Eppendorf, n.º de referencia 0030129512</li> <li>• Eppendorf, n.º de referencia 30129580</li> <li>• Eppendorf, n.º de referencia 30129598</li> <li>• Eppendorf, n.º de referencia 30129660</li> <li>• Eppendorf, n.º de referencia 30129679</li> <li>• Bio-Rad, n.º de referencia HSP9601</li> </ul>
<p>Uno de los siguientes cierres:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Microsello metálico «F»</li> <li>• Cierres metálicos</li> </ul>	<p>Bio-Rad, n.º de catálogo MSF1001</p> <p>Beckman Coulter, n.º de artículo 538619</p>
<p>Tubo de recogida de sangre para ADN fetal libre circulante con marcado CE</p>	<p>Streck, n.º de catálogo 218997</p>
<p>Tapas a presión</p>	<p>Sarstedt, n.º de pedido 65.802</p>
<p>Tubos con tapa de rosca de 2 ml</p>	<p>Proveedor de laboratorio general</p>
<p>Puntas de filtros de 20 µl para pipeta de 20 µl</p>	<p>Proveedor de laboratorio general</p>

Consumible	Proveedor
Puntas de filtros de 200 µl para pipeta de 200 µl	Proveedor de laboratorio general
Puntas de filtros de 1000 µl para pipeta de 1000 µl	Proveedor de laboratorio general
Equivalente: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Un aerosol desinfectante rápido con alcohol</li> <li>• Una solución de detergente desinfectante</li> </ul> Recomendado: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua desionizada y etanol al 70 %</li> </ul>	Proveedor de laboratorio general

## Materiales opcionales, no suministrados

Consumible	Proveedor
Solución salina tampón fosfato Dulbecco (DPBS) para control sin cadena molde (NTC)	Proveedor de laboratorio general
Tubo, tapa de rosca, 10 ml (solo para las muestras de control)	Sarstedt, n.º de pedido 60.551
Tubo, tapa de rosca, 50 ml	Proveedor de laboratorio general
Pipetas serológicas de 25 ml	Proveedor de laboratorio general
Pipetas serológicas de 10 ml	Proveedor de laboratorio general

## Recopilación, transporte y almacenamiento de muestras

### PRECAUCIÓN

Manipule todas las muestras como si fueran agentes potencialmente infecciosos.

- Deben recogerse de 7 ml a 10 ml de muestras de sangre completa en Streck Cell-Free DNA BCT. No las congele.
- El transporte de la sangre completa debe efectuarse conforme a la normativa aplicable al transporte de agentes etiológicos. Se recomienda usar métodos urgentes de envío o transporte.
- Durante el transporte, las muestras deben almacenarse a una temperatura de entre 4 °C y 30 °C. Una vez recibidas, almacénelas a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C hasta que vaya a utilizarlas. Entre la recogida de sangre y el aislamiento del plasma inicial no deben transcurrir más de cinco días.
- En caso de que sea necesario volver a realizar las pruebas, las muestras posprocesamiento pueden volver a taparse y almacenarse a 4 °C durante un periodo de cinco días más (hasta un total de diez días desde la recogida de la sangre).



## PRECAUCIÓN

La exposición a temperaturas elevadas superiores a los intervalos anteriores puede afectar negativamente a las tasas de error de las muestras individuales o al rendimiento de las muestras.

# Advertencias y precauciones

- Este ensayo contiene proteinasa K. Evite su inhalación, ingestión y el contacto con la piel o los ojos, puesto que puede provocar lesiones. Úselo en un área bien ventilada, use ropa de protección, evite respirar el polvo y deseche los contenedores y los contenidos no usados de acuerdo con las normativas de seguridad oficiales de su zona.
- Este ensayo contiene cloruro de guanidinio. Evite su inhalación, ingestión y el contacto con la piel o los ojos, puesto que puede provocar lesiones. Úselo en un área bien ventilada, use ropa de protección y deseche los contenedores y los contenidos no usados de acuerdo con las normativas de seguridad oficiales de su zona.
- Este ensayo contiene 2-propanol, un producto químico inflamable. Manténgalo lejos del calor y de llamas sin protección. Evite su inhalación, ingestión y el contacto con la piel o los ojos, puesto que puede provocar lesiones. Úselo en un área bien ventilada, use ropa de protección y deseche los contenedores y los contenidos no usados de acuerdo con las normativas de seguridad oficiales de su zona.
- Este ensayo contiene dimetilsulfóxido, un líquido corrosivo y combustible. Evite su inhalación, ingestión y el contacto con la piel o los ojos, puesto que puede provocar lesiones. Úselo en un área bien ventilada, use ropa de protección y deseche los contenedores y los contenidos no usados de acuerdo con las normativas de seguridad oficiales de su zona.
- Para evitar la formación de gases peligrosos, no deseche los residuos de extracción de ADN fetal libre circulante (que contienen clorhidrato de guanidina) con residuos que contengan lejía (hipoclorito de sodio).
- Manipule todas las muestras como si contuvieran agentes potencialmente infecciosos.
- Utilice las precauciones rutinarias del laboratorio. No pipetee con la boca. No coma, beba ni fume en las zonas de trabajo designadas. Use guantes desechables y batas de laboratorio para la manipulación de muestras y reactivos del ensayo. Lávese bien las manos tras la manipulación de muestras y reactivos del ensayo.
- No use los componentes del ensayo una vez alcanzada la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la caja del ensayo. No intercambie los componentes del ensayo de lotes de ensayo distintos. Los lotes de ensayo se identifican con la etiqueta de la caja del ensayo. Almacene los componentes de ensayo a la temperatura especificada.
- Para evitar la degradación de las muestras o los reactivos, asegúrese de que se hayan disipado por completo todos los vapores del hipoclorito de sodio usado para limpiar antes de comenzar cualquier protocolo.
- El incumplimiento de los procedimientos descritos puede provocar resultados erróneos o una reducción considerable de la calidad de las muestras.

- Comunique de inmediato cualquier incidente grave relacionado con este producto a Illumina y las autoridades competentes de los Estados miembros en los que se encuentren el usuario y el paciente.
- Para obtener información medioambiental, sanitaria y de seguridad, consulte las hojas de datos de seguridad (SDS) en [support.illumina.com/sds.html](https://support.illumina.com/sds.html).

## Notas del procedimiento

### Procedimiento para evitar la contaminación

- Use puntas y materiales de laboratorio consumibles recién preparados.
- Use puntas resistentes a aerosoles para reducir el riesgo de transferencia y contaminación cruzada entre muestras.
- Dado que existe posibilidad de contaminación, extreme las precauciones para asegurarse de que el contenido permanece íntegramente en el pocillo. Evite las salpicaduras de contenido. Centrifugue después de cada paso de agitación en un mezclador vorticial.
- Siga la normativa aplicable a las prácticas de laboratorio y de higiene al manipular sangre y sus derivados.
- No rocíe con aerosol de lejía cuando lleve a cabo la preparación de librerías. La contaminación por rastros de lejía puede provocar un error en el ensayo.
- Cuando retire el sello de una placa, colóquela con cuidado sobre una superficie firme y plana, y sujétela con firmeza. Retire lentamente el sello asegurándose de que este no entre en contacto con los pocillos expuestos. Tenga cuidado de no tocar los pocillos expuestos ni alterar el contenido. La contaminación cruzada entre pocillos puede producir resultados incorrectos.

### Limpieza de la plataforma de VeriSeq NIPT Microlab STAR

- Compruebe si la plataforma está limpia antes de usarla. Realice el mantenimiento semanal y siga estas instrucciones de limpieza al menos una vez en semana.
- Quite todos los portadores no descargables, límpielos con un spray desinfectante rápido con alcohol de agua desionizada y etanol al 70 % y déjelos secar. Si están muy sucios, sumérjalos después en una solución de detergente desinfectante, enjuáguelos con el desinfectante con alcohol y déjelos secar-.
- Abra la cubierta delantera y limpie la plataforma con un trapo empapado en agua desionizada y etanol al 70 %. Debe comprobar especialmente la limpieza de los bloques deslizantes.
- Quite el distribuidor del sistema de vacío básico (BVS) y limpie el distribuidor, la junta y los compartimentos interiores del BVS con un trapo. Evite limpiar la junta con etanol: puede quebrar el material.
- Quite los residuos de las puntas del cabezal de 96 pipetas CORE y el canal independiente.

- Retire de la estación de residuos de puntas la placa de extracción de puntas del canal independiente y límpiela: rocíe con agua desionizada y etanol al 70 % directamente sobre la superficie y límpiela con un trapo. Coloque una nueva bolsa de plástico sobre el marco y vuelva a colocarla. Coloque la placa de extracción de puntas limpia de nuevo en su sitio.
- Rocíe agua desionizada y etanol al 70 % directamente sobre la superficie de la caja y del contenedor de residuos del cabezal de 96 pipetas CORE, y límpiela con un trapo.
  - Si es difícil quitar la acumulación de los residuos de las puntas, limpie con un trapo humedecido con agua sin ADNasa ni ARNasa hasta quitar la acumulación. Deseche el trapo de manera adecuada. Proceda a esterilizar con el desinfectante con alcohol.
- Humedezca un trapo que no deje pelusa o un hisopo de algodón con etanol al 70 %. Limpie la ventana del lector láser del lector de códigos de barras con el hisopo. Con el mismo trapo o hisopo, limpie todos los pocillos del adaptador de placas CPAC. Si usa un trapo, utilice la parte trasera de un bolígrafo para apretar contra el interior de cada pocillo del adaptador. De este modo, se asegura de que el fondo del pocillo se limpia correctamente.
- Limpie los canales independientes:
  - En los canales independientes, limpie el revestimiento de expulsión de las puntas (parte exterior de los canales de pipeteo) con un trapo que no deje pelusa humedecido con agua desionizada y etanol al 70 %. (Consulte la *guía de referencia de Hamilton Microlab STAR*, n.º 15070074).
  - Limpie la arandela de fijación y las juntas tóricas del cabezal de pipeteo (parte exterior de los canales de pipeteo) con un trapo que no deje pelusa humedecido con agua desionizada y etanol al 70 %.
- Limpie el cabezal de 96 pipetas CORE:
  - Utilice el mismo trapo humedecido en agua desionizada y etanol al 70 %, limpie la funda del cabezal de 96 pipetas y la parte inferior de las arandelas de fijación.
  - Con este mismo trapo, o con un jirón de este, humedecido con agua desionizada con etanol al 70 %, limpie los laterales de los canales de pipeteo del cabezal de 96 pipetas para limpiar las juntas tóricas. Para ello, use el paño como si fuera hilo dental. Repita este procedimiento en cada canal de pipeteo del cabezal de 96 pipetas.
- Rocíe agua desionizada y etanol al 70 % sobre las cubiertas delantera y lateral, y séquelas con un paño.
- Limpie la cinta protectora de carga automática con un trapo humedecido con agua desionizada y etanol al 70 % sin ejercer presión.
- Cuando la plataforma y los componentes estén completamente secos, sustituya los portadores.

**NOTA** Una limpieza y mantenimiento incorrectos de ML STAR puede provocar contaminación cruzada y afectar negativamente al rendimiento del ensayo.

## Control de calidad

Se puede realizar una evaluación del material de control con características de rendimiento conocidas para detectar diferencias en el procesamiento y los procedimientos técnicos en laboratorio.

Los experimentos con una muestra de control o de control sin cadena molde reducen el número total de muestras maternas desconocidas que se pueden procesar con cada kit de preparación de muestras.

No use más de dos muestras de NTC por cada lote de 24 o 48 muestras ni más de cuatro muestras de NTC por cada lote de 96 muestras.

## Instrucciones de uso

### Sugerencias y técnicas

A menos que se haya especificado un punto de detención de seguridad en el protocolo, continúe inmediatamente con el siguiente paso.

#### Colocación del código de barras en las placas

- Los códigos de barras para placas de borde completo comienzan por PL.
- Los códigos de barras para placas de pocillos profundos comienzan por DW.
- Aplique los códigos de barras a las placas de borde completo y las de pocillos profundos en el lado junto a la columna 12.
- Cargue las placas con el código de barras orientado hacia arriba para permitir el escaneo automatizado.

#### Sellado y retirada de sello de la placa

- Extreme las precauciones para evitar la contaminación cruzada, no debe haber líquido visible en el lado invisible del sello.
  - Asegúrese de que el lado invisible de la junta expuesto no entre en contacto con los pocillos expuestos.
  - Tenga precaución para no tocar los pocillos expuestos.
- Selle siempre la placa de 96 pocillos antes de llevar a cabo los siguientes pasos del protocolo:
  - Pasos de centrifugado
  - Pasos de termociclado
- Para sellar la placa, aplíquelo el sello metálico y después la junta. Asegúrese de que se aplica presión a toda la placa y de que la junta es hermética en cada pocillo individual.
- Antes de retirar la junta de la placa, realice lo siguiente:
  - Centrifugue brevemente la placa de 96 pocillos a 1000 × g durante 20 segundos.
  - Coloque la placa sobre una superficie plana y, a continuación, retire lentamente la junta.

## VeriSeq NIPT Microlab STAR

- Antes de su uso, realice y registre el mantenimiento necesario conforme a las instrucciones del fabricante.
- Observe ML STAR durante los pasos automatizados. Supervise la interfaz del software VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 para ver las indicaciones y las instrucciones para el operador.
- La cubierta delantera debe estar colocada durante el funcionamiento.
- No debe haber ningún objeto en la plataforma.
- Si aparece un botón con la opción **Exclude** (Excluír) durante un evento de manipulación de errores, no seleccione esta opción bajo ningún concepto. Si no es posible continuar con el método después del evento de manipulación de errores o tiene pocas opciones para dicha manipulación, cancele el experimento.
- Durante los pasos de vacío de la placa, si VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 se lo indica, ayude manualmente a formar la junta entre la placa y el distribuidor de vacío.
- Deje que el sistema deseche automáticamente las puntas del adaptador. No quite las puntas manualmente a menos que se lo indique el software.
- Quite los reactivos gastados y los consumibles usados conforme a las indicaciones de Workflow Manager.
- Vacíe a diario los depósitos de residuos de vacío. El primer depósito no debe superar nunca la mitad de su capacidad. El desbordamiento de los residuos de vacío puede dañar la bomba de vacío y reducir el vacío aplicado al sistema.
- En los lotes de 24, 48 y 96 muestras, cargue una gradilla completa de las puntas de 8 canales contadas individualmente antes de iniciar el método.

## Procesamiento de muestras

### Procedimiento

1. Complete los siguientes pasos para cada alícuota:
  - a. Centrifugue las muestras con código de barras a 1600 × g durante 10 minutos a 4 °C con el freno desactivado.
  - b. Cuando la centrifugadora se detenga por completo, retire los tubos de muestras.  
Tras el centrifugado, inicie el aislamiento de plasma antes de 15 minutos. Si transcurren más de 15 minutos, vuelva a centrifugar.
2. Inspeccione todos los tubos para determinar la idoneidad de la muestra comprobando los siguientes requisitos:
  - El volumen de muestra es el esperado.
  - Tras la centrifugación, es visible una clara separación entre la capa de glóbulos rojos y la plasmática.
  - El nivel de plasma es de al menos 1,5 ml por encima de la capa leucocitaria.
  - La muestra no está muy hemolizada (es decir, el plasma no es de un color rojo oscuro).

- La muestra no tiene un aspecto lechoso (es decir, el plasma no tiene un aspecto blanco y turbio o lechoso y opaco).
- No se observa coagulación en la muestra.



### PRECAUCIÓN

Las muestras que no se han conservado o manipulado de la manera adecuada pueden no ser aptas para su uso. Si se procesan muestras no aptas con el flujo de trabajo, estas pueden causar una obstrucción en la placa de unión durante las extracciones y provocar desbordamientos de muestra en los pocillos adyacentes.

3. Destape los tubos y cárguelos en los portatubos. Cargue todas las muestras y cualquier control de plasma del lote.



### PRECAUCIÓN

Si en algún momento le aparece la opción Exclude (Exclure) durante un evento de manipulación de errores, no la seleccione. Si no es posible continuar con el método después del evento de manipulación de errores y tiene pocas opciones para dicha manipulación, cancele el experimento.

## Aislamiento de plasma

### Preparación

1. Etiquete una placa de pocillos profundos de plasma intermedio y adhiérole un código de barras.
2. Etiquete una placa de pocillos profundos de plasma final y adhiérole un código de barras.
3. En los lotes de 24, 48 y 96 muestras, cargue una gradilla completa de las puntas de 8 canales contadas individualmente antes de iniciar el método.



### PRECAUCIÓN

Asegúrese de usar el tipo de placa correcto para las placas de plasma intermedio y plasma final. El uso de un depósito de pocillos profundos en lugar de una placa de pocillos profundos da lugar a la amalgamación de muestras, de modo que se pueden generar resultados incorrectos.

## Procedimiento

1. Abra AppLauncher y, a continuación, seleccione **VeriSeq NIPT Method** (Método de VeriSeq NIPT).
2. Introduzca un ID único de lote y el nombre de usuario y, a continuación, haga clic en **OK** (Aceptar).  
El ID de lote puede contener ≤26 caracteres. Puede usar números, letras, guiones bajos (\_) o guiones medios (-). Por ejemplo: 2025-10-16\_Batch3.  
El ID de lote no distingue entre mayúsculas y minúsculas. Los ID de lote que distinguen entre mayúsculas y minúsculas no se consideran únicos.  
Los nombres de lote deben ser únicos y no deben diferenciarse únicamente por el uso de mayúsculas. Por ejemplo, los nombres de lote Batch01 y batch01 no son únicos. Esta misma regla se aplica a la asignación de nombres de ID de muestra.
3. Seleccione **New Batch** (Lote nuevo).
4. Tras el inicio, haga clic en **OK** (Aceptar) para iniciar el aislamiento de plasma.
5. Seleccione el tamaño del lote y, a continuación, haga clic en **OK** (Aceptar).
6. Seleccione el número de controles sin cadena molde (NTC, No Template Controls) y, a continuación, haga clic en **OK** (Aceptar).  
Las ranuras de NTC siempre son las últimas ranuras seleccionadas. Por ejemplo, con dos NTC en un experimento de 24 muestras, las posiciones 23 y 24 son los NTC.
7. Realice uno de los siguientes pasos:

- A fin de cargar una hoja de muestras existente, seleccione la que se encuentra asociada al lote y, a continuación, haga clic en **OK** (Aceptar).
- Para continuar sin seleccionar una hoja de muestras, seleccione **No Sample Sheet** (Sin hoja de muestras).

Para obtener información sobre cómo crear una hoja de muestras, consulte la *VeriSeq NIPT Solution v2 Software Guide (Guía de software de VeriSeq NIPT Solution) v2* (n.º de documento 1000000067940).

**NOTA** A fin de garantizar un adecuado análisis de los datos, debe registrarse con precisión para cada muestra el tipo de muestra, si se trata de embarazo de un único embrión o de un embarazo gemelar. Si selecciona **No Sample Sheet** (Sin hoja de muestras), asegúrese de que ha definido los valores predeterminados en las Service Tools (Herramientas de servicios) de Workflow Manager. Para obtener más información, consulte la *VeriSeq NIPT Solution v2 Software Guide (Guía de software de VeriSeq NIPT Solution v2)* (n.º de documento 1000000067940).

8. Confirme que todos los códigos de barras estén colocados y, a continuación, cargue las muestras, las puntas y las placas (con el código de barras orientado hacia la derecha) en el portador.

9. Haga clic en **OK** (Aceptar) cada vez que se muestre un mensaje de carga.

Tamaño del lote de muestras	Portador Tipo	Pista	Elemento	Posición del centro
24, 48, 96	Punta	7-12	Puntas de 1000 µl	5
			Puntas de 1000 µl (solo lote de 96)	4, 5
	Tubo	15	Tubos de muestras de sangre preparados 1-24 (para lotes de todos los tamaños)	1-24
	Tubo	16	Tubos de muestras de sangre preparados 25-48 (solo para lotes de los tamaños 48 y 96)	25-48
	Tubo	17	Tubos de muestras de sangre preparados 49-72 (solo para lotes del tamaño 96)	49-72
	Tubo	18	Tubos de muestras de sangre preparados 73-96 (solo para lotes del tamaño 96)	73-96
	Multiflex	19-24	Placa de pocillos profundos vacía, plasma final, con código de barras	4
	Multiflex	19-24	Placa de pocillos profundos vacía, plasma intermedio, con código de barras	5
	Reactivo	47	<b>[Opcional]</b> Solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS): se usa para control sin cadena molde (NTC)	5

10. Asegúrese de que los portadores, el material de laboratorio y los reactivos están cargados correctamente.
11. En la pantalla Pre-Spin Deck Verification (Verificación de la plataforma previa al centrifugado), haga clic en **OK** (Aceptar).
12. Observe ML STAR mientras realiza los pasos automatizados.
13. Si recibe un mensaje de Workflow Manager, compruebe que la plataforma de carga de ML STAR no tiene obstrucciones y permite que ML STAR descargue los portadores.
14. Seleccione **Unload** (Descargar) para descargar la plataforma.
15. Retire la placa de pocillos profundos de plasma intermedio de la siguiente manera.
- Inspeccione la placa para comprobar que los volúmenes de todos los pocillos sean homogéneos (que no haya errores de pipeta). El volumen previsto es de 1000 µl.
  - Registre cualquier incoherencia cuando haya terminado el procedimiento de aislamiento de plasma.
  - Selle la placa, realice la carga de manera equilibrada y centrifugue a 5600 × g durante 10 minutos con el freno desactivado o con la configuración más baja.
16. Seleccione **Yes** (Sí) para continuar con la preparación del plasma final.

17. Retire el sello de la placa y cárguela de nuevo en el portador.

Tamaño del lote de muestras	Portador Tipo	Pista	Elemento	Posición del centro
24, 48, 96	Multiflex	19-24	Placa de pocillos profundos de plasma intermedio	5

18. Seleccione la casilla de verificación **Intermediate Plasma plate has been spun** (Se ha centrifugado la placa de plasma intermedio) y, a continuación, haga clic en **OK** (Aceptar).

19. Observe ML STAR mientras realiza los pasos automatizados.

20. Si recibe un mensaje de Workflow Manager, compruebe que la plataforma de carga de ML STAR no tiene obstrucciones y permite que ML STAR descargue los portadores.

21. Seleccione **Unload** (Descargar) para descargar la plataforma.

22. Cuando Workflow Manager se lo indique, vacíe los portadores y la plataforma.

23. Retire la placa de pocillos profundos de plasma final.

24. Inspeccione la placa para comprobar los siguientes errores:

- Los volúmenes son homogéneos en todos los pocillos. El volumen previsto es de 900 µl.
- Los sedimentos de células son visibles.
- La hemólisis es excesiva.

Si observa anomalías en los sedimentos de células visibles o una hemólisis excesiva, invalide la muestra afectada al final del método de aislamiento de plasma o use Batch Manager. Para obtener más información sobre Batch Manager, consulte la *VeriSeq NIPT Solution v2 Software Guide (Guía de software de VeriSeq NIPT Solution v2)* (n.º de documento 1000000067940).

25. Cuando Workflow Manager se lo indique, haga clic en **OK** (Aceptar).

26. Escriba los comentarios sobre los pocillos afectados y, a continuación, haga clic en **OK** (Aceptar).

27. Realice uno de los siguientes pasos.

- Para avanzar a la extracción de ADNf1c, seleccione **Yes** (Sí).
- Para terminar, seleccione **Exit** (Salir).

## PUNTO DE DETENCIÓN DE SEGURIDAD

Si va a detener el proceso, selle la placa de plasma final y almacénela a una temperatura comprendida entre 2 °C y 8 °C durante un periodo de 7 días como máximo.

# Extracción de ADNf1c

## Preparación

1. Examine visualmente las cajas de extracción y de accesorios para confirmar que el kit no haya caducado.

2. Prepare los siguientes reactivos. Etiquete las cubetas de los depósitos y los depósitos de pocillos profundos con los nombres de los reactivos.

Reactivo	Almacenamiento	Instrucciones
Placa de pocillos profundos de plasma final	Entre 2 °C y 8 °C	Si estaba almacenada, déjela reposar durante 30 minutos hasta que alcance la temperatura ambiente. Centrifugue a 1000 × g durante 20 segundos. Retire el sello de la placa de pocillos profundos de plasma final antes de usarla.

3. Añada lentamente 3,75 ml de tampón de proteinasa a cada frasco de reactivo de proteinasa K.

- Prepare tres frascos para 24 y 48 muestras.
- Prepare cuatro frascos para 96 muestras.

4. Tape los frascos de proteinasa K y agite en vórtice hasta que se resuspenda.



### PRECAUCIÓN

No contamine el tapón de goma, ya que, si entra en contacto con otras sustancias, podría contaminar futuras muestras.

5. Agrupe la proteinasa K preparada de todos los frascos en una cubeta de reactivo y etiquételo indicando que se trata de proteinasa K.
6. Añada 100 ml de EtOH al 100 % a cada botella de reactivo de tampón de lavado II.
- Prepare un frasco para 24 y 48 muestras.
  - Prepare dos frascos para 96 muestras.
7. Invierta las botellas de tampón de lavado II para mezclar.
8. Marque las casillas de verificación en las botellas de tampón de lavado II.
9. Etiquete una nueva placa de borde completo intermedia y colóquese un nuevo código de barras de placa.
10. Etiquete una nueva placa de borde completo de elución de ADNflc y colóquese un nuevo código de barras de placa.
11. Etiquete una nueva placa de pocillos profundos de extracción intermedia y colóquese un nuevo código de barras de placa de pocillos profundos.
12. Coloque un código de barras de placa en la placa de unión de ADN.
13. Aplique un cierre metálico a los pocillos no usados para los lotes de 24 y 48 muestras.
14. Prepare una solución de limpieza de EtOH al 70 % (70 % de EtOH y 30 % de agua sin ADNasa ni ARNasa) para limpiar el sistema de vacío.

15. Prepare el sistema de vacío de la siguiente manera.
  - a. Quite el distribuidor de vacío y límpielo con EtOH al 70 %.  
Evite limpiar la junta con EtOH, ya que esto puede quebrar el material.
  - b. Vacíe los residuos de vacío.
  - c. Asegúrese de que el sistema de vacío de ML STAR esté activado.

## Procedimiento

1. Haga clic en **OK** (Aceptar) para iniciar la extracción del ADNflc.
2. Si no está abierto **VeriSeq NIPT Method**, realice lo siguiente:
  - a. Abra AppLauncher y, a continuación, seleccione **VeriSeq NIPT Method** (Método de VeriSeq NIPT).
  - b. Introduzca el ID de lote y el nombre de usuario y, a continuación, haga clic en **OK** (Aceptar).
3. Cargue las puntas en los portadores de puntas del modo siguiente y, a continuación, haga clic en **OK** (Aceptar).



### PRECAUCIÓN

Antes de iniciar el método para lotes de 24, 48 y 96 muestras, añada una gradilla completa de puntas de 8 canales.

Tamaño del lote de muestras	Tipo de portador	Pista	Elemento	Posición del centro
24	Punta	1-6	Puntas de 1000 µl	1
		7-12	Puntas de 300 µl	1
48	Punta	1-6	Puntas de 1000 µl	1, 2
		7-12	Puntas de 300 µl	1
96	Punta	1-6	Puntas de 1000 µl	1, 2, 3, 4
		7-12	Puntas de 300 µl	1

4. Cargue las puntas contadas en los portadores de puntas del modo siguiente.

Tamaño del lote de muestras	Tipo de portador	Pista	Elemento	Posición del centro
24, 48, 96	Punta	49-54	Puntas de 1000 µl	1
			Puntas de 300 µl	2
			Puntas de 50 µl	3

5. Introduzca la ubicación de la primera y la última punta de cada gradilla de puntas y, a continuación, haga clic en **OK** (Aceptar).
6. Escanee los códigos de barras de las cajas de extracción.

7. Introduzca el nombre de usuario o las iniciales del preparador del reactivo y, a continuación, haga clic en **OK** (Aceptar).
8. Escanee los códigos de barras de la caja de los accesorios.
9. Introduzca el nombre de usuario o las iniciales del preparador del reactivo y, a continuación, haga clic en **OK** (Aceptar).
10. Confirme que los códigos de barras están colocados.
11. Retire el sello de la placa de pocillos profundos de plasma final si es necesario.
12. Cargue las placas (con el código de barras orientado hacia la derecha) en el portador de placas del modo siguiente y, a continuación, haga clic en **OK** (Aceptar).

Tamaño del lote de muestras	Tipo de portador	Pista	Elemento	Posición del centro
24, 48, 96	Multiflex	19-24	Nueva placa con borde completo, intermedia, con código de barras	1
			Nueva placa con borde completo, elución de ADNfic, con código de barras	2
			Nueva placa de pocillos profundos, intermedia de extracción, con código de barras	4
			Placa de pocillos profundos de plasma final, con código de barras	5

13. Confirme que la placa de unión de ADN tiene código de barras y, a continuación, haga clic en **OK** (Aceptar).
14. En el caso de lotes con placa parcial, coloque un sello de placas recortadas sobre los pocillos in usar (columnas 4-12 para lotes de 24 muestras y columnas 7-12 para lotes de 48 muestras).
15. Cargue la placa de unión de ADN en el distribuidor de vacío con el código de barras orientado hacia la derecha.
16. Antes de colocar la placa de unión en el distribuidor de BVS, inspeccione visualmente los pocillos para detectar posibles obstrucciones.  
Esto puede impedir el flujo de reactivos durante el vacío.
17. Si usa lotes de 24 o 48 muestras, cubra los pocillos no usados y séllelos con sello metálico. Marque la casilla de verificación **Are DNA Binding Plate Columns Sealed?** (¿Está colocado el sello de las columnas de la placa de unión de ADN?) y, a continuación, haga clic en **OK** (Aceptar).

18. Cargue los tubos de reactivo en el portarreactivos del modo siguiente y, a continuación, haga clic en **OK** (Aceptar).

Tamaño del lote de muestras	Tipo de portador	Pista	Elemento	Posición del centro
24, 48	Reactivo	47	Tampón de elución, 16 ml	1
			Proteinasa K, 11 ml	2
96	Reactivo	47	Tampón de elución, 16 ml	1
			Proteinasa K, 15 ml	2

19. Transfiera los reactivos especificados a los depósitos de pocillos profundos y, a continuación, cargue los depósitos en los portadores de pocillos profundos como se indica a continuación.

20. Haga clic en **OK** (Aceptar).

Tamaño del lote de muestras	Tipo de portador	Pista	Elemento	Posición del centro
24, 48	Pocillo profundo	39-44	Tampón de lavado II, 125 ml	1
			Tampón de lavado I, 125 ml	2
			EtOH al 100 %, 60 ml	3
			Tampón de lisis, 100 ml	4
			Agua sin ARNasa ni ADNasa, 60 ml	5
96	Pocillo profundo	39-44	Tampón de lavado II, 200 ml	1
			Tampón de lavado I, 125 ml	2
			EtOH al 100 %, 100 ml	3
			Tampón de lisis, 100 ml	4
			Agua sin ARNasa ni ADNasa, 100 ml	5

21. Espere a que finalice la comprobación automatizada de volúmenes de reactivos.
22. Confirme que el depósito de residuos de vacío esté vacío (se recomienda la mitad de su capacidad completa) y, a continuación, haga clic en **OK** (Aceptar).
23. Confirme la colocación de todos los portadores, materiales de laboratorio y reactivos y, a continuación, haga clic en **OK** (Aceptar) en la pantalla Extraction Deck Verification (Verificación de plataforma de extracción).
24. Observe ML STAR durante los pasos automatizados.



## PRECAUCIÓN

Debe invalidar manualmente los desbordamientos de muestra que no haya detectado el sistema antes de que puedan contaminarse los pocillos cercanos.

25. Tras el paso de vacío final, retire la placa de unión de ADN y limpie la superficie inferior con EtOH al 70 %.
26. Selle cualquier pocillo no tapado en la placa de unión de ADN y, a continuación, coloque la placa de unión de ADN en la placa de pocillos profundos de plasma final vacía.
27. Centrifugue el conjunto de placa de unión de ADN y placa de plasma final a 5600 × g durante 10 minutos con el freno aplicado.
28. Haga clic en **OK** (Aceptar).
29. Durante el centrifugado de la placa de unión de ADN, realice la limpieza de vacío:
  - a. Retire el distribuidor de vacío y, a continuación, haga clic en **OK** (Aceptar).
  - b. Espere a que finalice la limpieza de residuos automatizada.
  - c. Limpie el distribuidor de vacío y el interior del sistema de vacío con EtOH al 70 % y, a continuación, reemplace el distribuidor de vacío.
  - d. Marque la casilla de verificación **Manifold is on Vacuum** (El distribuidor está en vacío) para iniciar la transferencia de la placa de elución en el distribuidor de vacío y, a continuación, haga clic en **OK** (Aceptar).
30. Tras el centrifugado, retire el sello de los pocillos que contienen muestras de la placa de unión de ADN.
31. Coloque la placa de unión de ADN en la parte superior de la placa de elución de ADNflc que está en el distribuidor de vacío.
32. Cargue la placa de unión de ADN con el código de barras a la derecha y, a continuación, haga clic en **OK** (Aceptar).
33. Observe ML STAR durante los pasos automatizados.
34. Después del paso de incubación, seleccione la casilla de verificación **Plates are assembled as indicated** (Las placas están colocadas conforme se indica). Confirme que el conjunto de la placa de unión de ADN y la placa de elución de ADNflc está sobre una base de apoyo (si lo requiere la centrifugadora).
35. Selle los pocillos descubiertos en la placa de unión de ADN.
36. Centrifugue a 5600 × g durante 2 minutos con el freno activado y, a continuación, haga clic en **OK** (Aceptar).
37. Inspeccione visualmente la placa de elución de ADNflc para comprobar que los volúmenes de cada pocillo sean homogéneos.

El volumen previsto es de aproximadamente 55 µl.
38. Selle y conserve la placa de elución de ADNflc para la preparación de librerías.
39. Si recibe un mensaje de Workflow Manager, compruebe que la plataforma de carga de ML STAR no tiene obstrucciones y permite que ML STAR descargue los portadores.
40. Seleccione **Unload** (Descargar) para descargar la plataforma.

41. Descargue todos los portadores y limpie la plataforma de ML STAR; a continuación, haga clic en **OK** (Aceptar).
42. Escriba los comentarios sobre los pocillos afectados y, a continuación, haga clic en **OK** (Aceptar).
43. Realice uno de los siguientes pasos:
  - Para ir a la preparación de librerías, haga clic en **Yes** (Sí).
  - Para terminar, seleccione **Exit** (Salir).

#### **PUNTO DE DETENCIÓN DE SEGURIDAD**

Si va a detener el proceso, selle la placa de elución de ADN fetal libre circulante y almacénela a una temperatura comprendida entre -25 °C y -15 °C durante un periodo de 7 días como máximo.

## Preparación de librerías

### Preparación

1. Examine visualmente las cajas de preparación de librerías y de accesorios para confirmar que los kits no hayan caducado.
2. Prepare los siguientes reactivos. Etiquete los cubos de los depósitos y los depósitos de pocillos profundos con los nombres de los reactivos.

Reactivo	Almacenamiento	Instrucciones
Mezcla de adición de cola de A	Entre -25 °C y -15 °C	Descongele a temperatura ambiente. Agite en vórtice para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.
Placa de elución de ADN fetal libre circulante	Entre -25 °C y -15 °C	Si la placa estaba almacenada, confirme que no llevaba más de siete días y que se ha descongelado a temperatura ambiente. Agite en vórtice a 1500 r/min durante 1 minuto. Centrifugue a 1000 × g durante 20 segundos.
Mezcla de reparación de extremos	Entre -25 °C y -15 °C	Descongele a temperatura ambiente. Agite en vórtice para mezclar.
Tampón de hibridación	Entre -25 °C y -15 °C	Descongele a temperatura ambiente. Agite en vórtice para mezclar. <b>Devuelva al almacenamiento después de su uso.</b>
Mezcla de ligadura	Entre -25 °C y -15 °C	Descongele a temperatura ambiente. Agite en vórtice para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.
Placa adaptadora de ADN de NIPT	Entre -25 °C y -15 °C	Descongele a temperatura ambiente. Agite en vórtice para mezclar. Centrifugue a 1000 × g durante 20 segundos.
Tampón de resuspensión	Entre 2 °C y 8 °C	Agite en vórtice para mezclar. <b>Devuelva al almacenamiento después de su uso.</b>
Bolas de purificación de muestras	Entre 2 °C y 8 °C	Deje reposar durante 30 minutos hasta que alcance la temperatura ambiente. Agite enérgicamente con un vórtice antes de cada uso. Mezcle con un vórtice o inversor hasta que todas las bolas estén en suspensión y la mezcla sea homogénea.



## PRECAUCIÓN

Al retirar el sello de la placa adaptadora de ADN de NIPT, extreme las precauciones para evitar la contaminación cruzada por aerosoles de un pocillo a otro, que puede producir resultados incorrectos.

3. Si la placa de ADNflc se almacenó congelada, prepárela como se indica a continuación.
  - a. Descongele a temperatura ambiente.
  - b. Agite en vórtice a 1500 r/min durante 1 minuto.
  - c. Centrifugue a 1000 × g durante 20 segundos.
4. Etiquete una nueva placa con faldón de librerías y colóquela un nuevo código de barras de placa.
5. Prepare EtOH al 80 % a partir de EtOH puro. Combine 40 ml de EtOH al 100 % y 10 ml de agua sin ADNasa ni ARNasa. Invierta para mezclar.
6. Asegúrese de que la regulación térmica de ML STAR esté activada.

## Dilución de enzimas

1. Combine una mezcla de adición de cola de A con un tampón de resuspensión en un tubo con tapa de rosca. Agite en vórtice para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.

Tamaño del lote de muestras	Mezcla de adición de cola de A (µl)	Tampón de resuspensión (µl)
24, 48	900	1200
96	1800	2400

2. Combine una mezcla de ligadura con un tampón de resuspensión en un tubo con tapa de rosca. Agite en vórtice para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.

Tamaño del lote de muestras	Mezcla de ligadura (µl)	Tampón de resuspensión (µl)
24, 48	230	1713
96	440	3278

## Procedimiento

1. Seleccione **OK** (Aceptar) para iniciar la preparación de librerías. Si aún no está abierto **VeriSeq NIPT Method**, realice lo siguiente:
  - a. Abra AppLauncher y seleccione **VeriSeq NIPT Method** (Método de VeriSeq NIPT).
  - b. Introduzca el ID de lote y el nombre de usuario y, después, seleccione **OK** (Aceptar).
2. Confirme que los siguientes consumibles están listos conforme a las indicaciones de la pantalla Reagent Preparation (Preparación de reactivos):
  - Mezcla de adición de cola de A, mezcla de ligadura y EtOH al 80 %
  - Bolas de purificación de muestras, mezcla de reparación de extremos y placa adaptadora de ADN de NIPT

3. Seleccione las casillas de verificación y seleccione **OK** (Aceptar).
4. Escanee los códigos de barras de la caja de preparación de librerías.
5. Introduzca el nombre de usuario o las iniciales del preparador del reactivo y, después, seleccione **OK** (Aceptar).
6. Escanee los códigos de barras de la caja de los accesorios.
7. Introduzca el nombre de usuario o las iniciales del preparador del reactivo y, después, seleccione **OK** (Aceptar).
8. Cargue las puntas en los portadores de puntas del modo siguiente y, después, seleccione **OK** (Aceptar) para cada portador.

Tamaño del lote de muestras	Tipo de portador	Pista	Elemento	Posición del centro
24	Punta	1–6	Puntas de 50 µl	1
		7–12	Puntas de 300 µl	1 y 2
48	Punta	1–6	Puntas de 50 µl	1 y 2
		7–12	Puntas de 300 µl	1, 2, 3 y 4
96	Punta	1–6	Puntas de 50 µl	1, 2, 3 y 4
		7–12	Puntas de 300 µl	1, 2, 3, 4 y 5

9. Si detuvo el protocolo tras el procedimiento de extracción de ADN fetal libre circulante, cargue las puntas contadas en los portadores de puntas del modo siguiente.

Tamaño del lote de muestras	Tipo de portador	Pista	Elemento	Posición del centro
24, 48 y 96	Punta	49–54	Puntas de 1000 µl	1
			Puntas de 300 µl	2
			Puntas de 50 µl	3

10. Introduzca la ubicación de la primera punta de cada gradilla de puntas y, después, seleccione **OK** (Aceptar).

11. Confirme que los códigos de barras están colocados y cargue las placas (con el código de barras orientado hacia la derecha) en el portador de placas del modo siguiente. Después, seleccione **OK** (Aceptar).

Tamaño del lote de muestras	Tipo de portador	Pista	Elemento	Posición del centro
24, 48 y 96	Multiflex	19–24	Placa de elución de ADNflc, con código de barras	1
			Placa adaptadora de ADN de NIPT, con código de barras	2
			Nueva placa de 96 pocillos con borde completo, librerías, con código de barras	3
			Nuevas placas de 96 pocillos con borde completo	4 y 5

12. Cargue el portador de pocillos profundos del modo siguiente y, después, seleccione **OK** (Aceptar).

Tamaño del lote de muestras	Tipo de portador	Pista	Elemento	Posición del centro
24, 48 y 96	Pocillo profundo	39–44	50 ml de EtOH al 80 % en un depósito de pocillo profundo	1
			Nuevas placas de 96 pocillos con borde completo	2, 3, 4, 5

13. Cargue los tubos de reactivo en el portarreactivos del modo siguiente y, después, seleccione **OK** (Aceptar).

Tamaño del lote de muestras	Tipo de portador	Pista	Elemento	Posición del centro
24, 48 y 96	Reactivo	47	2,5 ml de mezcla de reparación de extremos	1
			Mezcla de adición de cola de A (volumen total)	2
			Mezcla de ligación preparada (volumen total)	3
			10 ml de bolas de purificación de muestras	4
			12 ml de tampón de hibridación	5

14. Guarde el resto de los 12 ml de tampón de hibridación (HT1) en el contenedor de agrupación.

15. Asegúrese de que los portadores, los materiales de laboratorio y los reactivos estén cargados como se indica; a continuación, seleccione **OK** (Aceptar) en la pantalla Library Deck Verification (Verificación de la plataforma de librerías).

16. Espere a que finalice la comprobación automatizada de volúmenes de reactivos.
17. Observe ML STAR durante los pasos automatizados.
18. Si recibe un mensaje de Workflow Manager, compruebe que la plataforma de carga de ML STAR no tiene obstrucciones y permite que ML STAR descargue los portadores.
19. Seleccione **Unload** (Descargar) para descargar la plataforma.
20. Inspeccione la placa de librerías para comprobar que los volúmenes de todos los pocillos sean homogéneos.



### PRECAUCIÓN

Si los volúmenes de los pocillos no son uniformes, es posible que las muestras no superen el control de calidad automático.

21. Selle y conserve la placa de librerías cuando la almacene.
22. Descargue todos los portadores, limpie la plataforma y, a continuación, seleccione **OK** (Aceptar).
23. Escriba los comentarios sobre los pocillos afectados y seleccione **OK** (Aceptar).
24. Realice uno de los siguientes pasos:
  - Para ir a la cuantificación de librerías, seleccione **Yes** (Sí).
  - Para terminar, seleccione **Exit** (Salir).

### PUNTO DE DETENCIÓN DE SEGURIDAD

Si va a detener el proceso, selle la placa de librerías antes de su almacenamiento. La placa de librerías permanece estable hasta 7 días a contar desde la fecha de preparación, a una temperatura comprendida entre -25 °C y -15 °C.

## Cuantificación de librerías

### Preparación

1. Prepare los siguientes reactivos:

Reactivo	Almacenamiento	Instrucciones
Reactivo de cuantificación de ADN	Entre 2 °C y 8 °C	Proteger de la luz. Descongele a temperatura ambiente durante entre 30 minutos y 150 minutos. (Se recomienda retirar el reactivo al inicio del procedimiento de preparación de librerías.) Agite en vórtice para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.
Estándar de cuantificación de ADN	Entre 2 °C y 8 °C	Agite en vórtice para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.

Reactivo	Almacenamiento	Instrucciones
Tampón de resuspensión	Entre 2 °C y 8 °C	Agite en vórtice para mezclar.

2. Si la placa de librerías se almacenó congelada, prepárela como se indica a continuación.
  - a. Confirme que la placa no llevaba más de 7 días y que se ha descongelado a temperatura ambiente.
  - b. Agite en vórtice para mezclar.
  - c. Centrifugue a 1000 × g durante 1 minuto.
3. Encienda el fluorímetro 10 minutos antes de usarlo.
4. Adhiera una etiqueta de código de barras en una nueva placa de 384 pocillos.
5. Adhiera una etiqueta de código de barras en una nueva placa de bordes completos.

## Procedimiento

1. Seleccione **OK** (Aceptar) para iniciar la cuantificación.
2. Si aún no está abierto VeriSeq NIPT Method, realice lo siguiente:
  - a. Abra AppLauncher y seleccione **VeriSeq NIPT Method** (Método de VeriSeq NIPT).
  - b. Introduzca el ID de lote y el nombre de usuario y, después, seleccione **OK** (Aceptar).
3. Escanee los códigos de barras de la caja de los accesorios.
4. Introduzca el nombre de usuario o las iniciales del preparador del reactivo y, después, seleccione **OK** (Aceptar).
5. Cargue las puntas en el portador de puntas del modo siguiente y, después, seleccione **OK** (Aceptar).

Tamaño del lote de muestras	Portador Tipo	Pista	Elemento	Posición del centro
24 y 48	Punta	1–6	Gradilla de puntas de 300 µl	1
			Gradilla de puntas de 50 µl	2
96	Punta	1–6	Gradilla de puntas de 300 µl	1
			Gradilla de puntas de 50 µl	2 y 3

6. Confirme que los códigos de barras están colocados.
7. Si lo necesita, retire la junta de la placa de librerías.

8. Cargue las placas (con el código de barras orientado hacia la derecha) en el portador Multiflex del modo siguiente y, a continuación, seleccione **OK** (Aceptar).

Tamaño del lote de muestras	Portador Tipo	Pista	Elemento	Posición del centro
24, 48 y 96	Multiflex	19–24	Nuevas placas con borde completo, con código de barras	1
			Nueva placa de 384 pocillos, con código de barras	2
			Placa de librerías, con código de barras	3
			Nuevas placas de 96 pocillos con borde completo	4 y 5

9. Cargue los tubos de reactivo sin tapa en el portatubos del modo siguiente y, después, seleccione **OK** (Aceptar).

Tamaño del lote de muestras	Portador Tipo	Pista	Elemento	Posición del centro
24, 48 y 96	Tubo	46	Estándar de cuantificación de ADN	1
			Reactivo de cuantificación de ADN	2

10. Cargue los tubos de reactivo en el portarreactivos del modo siguiente y, después, seleccione **OK** (Aceptar).

Tamaño del lote de muestras	Portador Tipo	Pista	Elemento	Posición del centro
24, 48 y 96	Reactivo	47	Nuevo tubo de reactivo (vacío)	1
			16 ml de tampón de resuspensión	2

11. Si detuvo el protocolo tras el procedimiento de extracción de preparación de librerías, cargue las puntas contadas en los portadores de puntas del modo siguiente.

Tamaño del lote de muestras	Portador Tipo	Pista	Elemento	Posición del centro
24, 48 y 96	Punta	49–54	Puntas de 1000 µl	1
			Puntas de 300 µl	2
			Puntas de 50 µl	3

12. Introduzca la ubicación de la primera y la última punta de cada gradilla de puntas y, después, seleccione **OK** (Aceptar).
13. Asegúrese de que los portadores, los materiales de laboratorio y los reactivos estén cargados como se indica; a continuación, seleccione **OK** (Aceptar) en la pantalla Quant Deck Verification (Verificación de la plataforma de cuantificación).
14. Espere a que finalice la comprobación automatizada de volúmenes de reactivos.
15. Observe ML STAR durante los pasos automatizados.
16. Si recibe un mensaje de Workflow Manager, compruebe que la plataforma de carga de ML STAR no tiene obstrucciones y permite que ML STAR descargue los portadores.
17. Seleccione **Unload** (Descargar) para descargar la plataforma.
18. Descargue la placa de librerías.
- Inspeccione la placa para comprobar que los volúmenes de todos los pocillos sean homogéneos.
  - Selle la placa de librerías y almacénela a temperatura ambiente hasta que se complete el análisis de datos fluorométricos.
19. Descargue las placas de 96 pocillos restantes e inspecciónelas para comprobar que los volúmenes de todos los pocillos sean homogéneos.  
Si hay errores notables en el volumen, tal vez haya un problema con los pasos del pipeteado.
20. Descargue la placa de 384 pocillos e inspecciónela para comprobar que haya líquido en los pocillos correspondientes.
21. Selle la placa con un sello metálico.
22. Centrifugue a 1000 × g durante 20 segundos.
23. Incube a temperatura ambiente y protegiendo de la luz durante 10 minutos.
24. Descargue todos los portadores.
25. Limpie la plataforma de ML STAR; a continuación, seleccione **OK** (Aceptar).



### PRECAUCIÓN

No deseche los reactivos de cuantificación hasta que se hayan obtenido los datos. Le harán falta los reactivos si necesita realizar una recuantificación.

26. Tras la incubación, quite el sello metálico y cargue la placa de 384 pocillos en el lector de microplacas. Asegúrese de usar la placa adaptadora de color violeta (Número de referencia: 0310-4336) proporcionada por Molecular Devices o equivalente si procede para el instrumento utilizado.
  - Al cargarla, asegúrese de que A1 esté en la esquina superior izquierda.
27. Haga doble clic en la plantilla de VeriSeq NIPT para abrirla en SoftMax Pro.
28. Seleccione **New Experiment** (Nuevo experimento) en la ficha Home (Inicio).
29. Seleccione **Read** (Leer).
30. Exporte los datos en formato XML como se explica a continuación.
  - a. Haga clic con el botón derecho en **Plate** (Placa) y, a continuación, seleccione **Rename** (Renombrar).
  - b. Realice la lectura del código de barras de la placa de cuantificación y, a continuación, seleccione **OK** (Aceptar).
  - c. Seleccione el icono de placa que aparece en la esquina superior izquierda y, a continuación, seleccione **Export** (Exportar) en el menú.
  - d. Marque la casilla de comprobación **Expt name** (Nombre de exportación), establezca la opción de fecha de placa como sin procesar, elija XML como formato de salida y, a continuación, seleccione **OK** (Aceptar).
  - e. Defina la ruta y el nombre del archivo de salida y seleccione **Save** (Guardar).  
Debe poderse acceder a la ubicación del archivo desde el ordenador Hamilton. No utilice espacios en el nombre ni en la ruta del archivo.

## Análisis

1. En la pantalla Scanner Information (Información del lector) de ML STAR, introduzca el ID del fluorímetro.
2. Escriba los comentarios sobre el experimento del fluorímetro y seleccione **OK** (Aceptar).
3. Navegue al archivo .xml de cuantificación que contiene los datos fluorométricos y, después, seleccione **OK** (Aceptar).
4. Revise los resultados de los análisis de curva estándar y concentración de muestras y, después, seleccione **OK** (Aceptar).
5. Si necesita repetir la lectura de la placa, seleccione **Rescan** (Repetir lectura).  
Las muestras se degradan con la luz y con el paso del tiempo. Si es necesario repetir la lectura, hágalo inmediatamente.
6. Escriba los comentarios sobre los pocillos afectados y seleccione **OK** (Aceptar).
7. Evalúe los resultados y continúe como se indica a continuación.
  - Si los resultados superan la especificación, vaya a [Agrupación de librerías, en la página 42](#). Para obtener información sobre las especificaciones, consulte la tabla de criterios de medición y límites de CC de la cuantificación en la *VeriSeq NIPT Solution v2 Software Guide (Guía de software de VeriSeq NIPT Solution v2)* (n.º de documento 1000000067940).
  - Si los resultados no superan la especificación, el sistema cancela el método. Repita los procedimientos de cuantificación empezando por [Preparación, en la página 37](#).

8. Realice uno de los siguientes pasos:

- Para ir a [Agrupación de librerías, en la página 42](#), seleccione **Yes** (Sí).
- Para terminar, seleccione **Exit** (Salir).

### PUNTO DE DETENCIÓN DE SEGURIDAD

Si va a detener el proceso, selle la placa de librerías antes de su almacenamiento. La placa de librerías permanece estable hasta 7 días almacenada a una temperatura comprendida entre -25 °C y -15 °C.

## Agrupación de librerías

### Preparación

1. Prepare los siguientes reactivos:

Reactivo	Almacenamiento	Instrucciones
Tampón de hibridación	Entre -25 °C y -15 °C	Descongele a temperatura ambiente. Agite en vórtice para mezclar. Devuelva al almacenamiento después de su uso.

- Si la placa de librerías se almacenó congelada, prepárela como se indica a continuación.
  - Confirme que la placa no llevaba más de 7 días y que se ha descongelado a temperatura ambiente.
  - Agite en vórtice a 1500 r/min durante 1 minuto.
  - Centrifugue a 1000 × g durante 20 segundos.
  - Pipetee para mezclar.
- Etiquete un tubo de agrupación vacío como Grupo A. En el caso de 96 muestras, etiquete un segundo tubo de agrupación vacío como Grupo B.
- Guarde el siguiente programa de desnaturalización en el termociclador con una tapa calentada.
  - Seleccione la opción de tapa precalentada y establezca la temperatura a 102 °C.
  - Establezca el volumen de la reacción en 50 µl.
  - Defina la tasa de incremento en el valor máximo (≥2 °C por segundo).
  - Incube a 96 °C durante 10 minutos y, después, a 4 °C durante 5 segundos.
  - Mantenga la temperatura a 4 °C.

### Procedimiento

- Coloque la placa de librerías en el termociclador preprogramado y ejecute el programa de desnaturalización.

No desnaturalice la placa de librerías antes de que la cuantificación haya superado los criterios de medición de CC: puede que quiera realizar una recuantificación.

- Centrifugue la placa de librerías a 1000 × g durante 20 segundos.
- Haga clic en **OK** (Aceptar) para iniciar la agrupación de librerías.

4. Si no está abierto VeriSeq NIPT Method, realice lo siguiente:
  - a. Abra AppLauncher y seleccione **VeriSeq NIPT Method** (Método de VeriSeq NIPT).
  - b. Introduzca el ID de lote y el nombre de usuario y, después, seleccione **OK** (Aceptar).
5. Seleccione la concentración del grupo y, a continuación, seleccione **OK** (Aceptar).  
La densidad de grupos objetivo es 220 000 a 260 000/mm<sup>2</sup>.

**NOTA** Puede ser necesario aumentar la concentración de los grupos o el volumen de los grupos para los lotes de 24 muestras a fin de mantener densidades de grupos similares a las obtenidas con lotes de 48/96 muestras.

6. Si se lo indica Workflow Manager, realice uno de los siguientes pasos:
  - Para cargar una hoja de muestras, seleccione la hoja de muestras asociada al lote y, a continuación, seleccione **Load** (Cargar).
  - Para usar los valores predeterminados del sistema con el resto de tipos de muestras, informes sobre el sexo o tipos de cribado, seleccione **Use Default** (Usar predeterminados) en cada ajuste.  
Para obtener información sobre cómo crear una hoja de muestras, consulte la *VeriSeq NIPT Solution v2 Software Guide (Guía de software de VeriSeq NIPT Solution v2)* (n.º de documento 1000000067940).
7. Haga clic en **Start** (Iniciar) para iniciar el temporizador de la desnaturalización de la placa.
8. Cargue las puntas en los portadores de puntas del modo siguiente.

Tamaño del lote de muestras	Portador Tipo	Pista	Elemento	Posición del centro
24, 48 y 96	Punta	7–12	Puntas de filtros de 50 µl	1

9. Cargue la placa de librería desnaturalizada (con el código de barras orientado hacia la derecha) en el portador Multiflex del modo siguiente y, a continuación, seleccione **OK** (Aceptar).

Tamaño del lote de muestras	Portador Tipo	Pista	Elemento	Posición del centro
24, 48 y 96	Multiflex	19–24	Placa de librería desnaturalizada (con código de barras)	1

10. Cargue los tubos de grupos en el portatubos del modo siguiente y, después, seleccione **OK** (Aceptar).

Tamaño del lote de muestras	Portador Tipo	Pista	Elemento	Posición del centro
24 y 48	Tubo	46	Nuevo tubo de 2 ml, grupo A	1
96	Tubo	46	Nuevo tubo de 2 ml, grupo A	1
			Nuevo tubo de 2 ml, grupo B	2

11. Cargue los tubos de reactivo en el portarreactivos del modo siguiente y, después, seleccione **OK** (Aceptar).

Tamaño del lote de muestras	Portador Tipo	Pista	Elemento	Posición del centro
24, 48 y 96	Reactivo	47	3 ml de tampón de hibridación	1

12. Cargue las puntas en los portadores de puntas del modo siguiente.

Tamaño del lote de muestras	Portador Tipo	Pista	Elemento	Posición del centro
24, 48 y 96	Punta	49–54	Puntas de filtros de 1000 µl	1
			Puntas de filtros de 300 µl	2
			Puntas de filtros de 50 µl	3

13. Introduzca la ubicación de la primera y la última punta de cada gradilla de puntas y, después, seleccione **OK** (Aceptar).
14. Asegúrese de que los portadores, el material de laboratorio y los reactivos están cargados según se indica.
15. En la pantalla Pooling Deck Verification (Verificación de la plataforma de agrupamiento), haga clic en **OK** (Aceptar).
16. Observe ML STAR durante los pasos automatizados.
17. Escriba los comentarios sobre los pocillos afectados y seleccione **OK** (Aceptar).
18. Si recibe un mensaje de Workflow Manager, compruebe que la plataforma de carga de ML STAR no tiene obstrucciones y permite que ML STAR descargue los portadores.
19. Seleccione **Unload** (Descargar) para descargar la plataforma.
20. Descargue el portatubos.
21. Tape todos los tubos de agrupación, agite en vórtice y, a continuación, centrifugue brevemente.
22. Seleccione **OK** (Aceptar).
23. Secuencie las librerías lo antes posible tras la agrupación. Selle la placa de librerías y almacénela a una temperatura comprendida entre -25 °C y -15 °C durante un periodo máximo de 7 días para permitir la reagrupación.

### PUNTO DE DETENCIÓN DE SEGURIDAD

Si va a detener el proceso, tape los tubos de agrupación y almacénelos a una temperatura comprendida entre -25 °C y -15 °C durante un periodo de 7 días como máximo.

# Preparación de librerías agrupadas para la secuenciación

## Preparación

1. Prepare los siguientes reactivos:

Reactivo	Almacenamiento	Instrucciones
Tubos de grupo	Entre -25 °C y -15 °C	Si han estado almacenados, deben descongelarse a temperatura ambiente. Agite en vórtice brevemente. Centrifugue brevemente.

2. Prepare el sistema de secuenciación de nueva generación; para ello, complete los siguientes campos en el módulo VeriSeq NIPT de Local Run Manager:
  - a. Run Name (Nombre del experimento)
  - b. **[Opcional]** Run Description (Descripción del experimento)
  - c. Pool Barcode (Código de barras de grupo)



### PRECAUCIÓN

El código de barras de grupo introducido en el módulo de Local Run Manager debe coincidir con el introducido en Workflow Manager. El software de análisis rechaza las configuraciones de experimentos incorrectas y se requiere una resecuenciación.

Para obtener más información sobre cómo usar el módulo VeriSeq NIPT de Local Run Manager, consulte la *VeriSeq NIPT Solution v2 Software Guide (Guía de software de VeriSeq NIPT Solution v2)* (n.º de documento 1000000067940).

## Procedimiento

1. Combine los siguientes volúmenes al cartucho de reactivos y, a continuación, pipetee para mezclar.
  - Tampón de hibridación (900 µl)
  - Grupo A de 450 µl (450 µl)
2. Prosiga con la secuenciación siguiendo la guía de referencia del instrumento de secuenciación de nueva generación que esté utilizando. Para NextSeq 550Dx, consulte la *NextSeq 550Dx Instrument Reference Guide (Guía de referencia de NextSeq 550Dx Instrument)* (n.º de documento: 1000000009513) (o consulte las instrucciones de uso correspondientes indicadas en la página de asistencia de Illumina en [www.support.illumina.com](http://www.support.illumina.com)).
3. Confirme que la configuración del experimento es correcta cuando se le indique.

4. Si es necesario, repita este procedimiento para el grupo B.
  - Para alcanzar el intervalo de densidad de grupos objetivo, la placa de librería puede reagruparse con una concentración del grupo distinta en el ordenador Hamilton. Al volver a crear el grupo se invalida el grupo original.
  - Si lo prefiere, puede modificar el cociente del grupo a HT1 (450 µl + 900 µl) para alcanzar el intervalo de densidad de grupos objetivo.

## Secuenciación de nueva generación

VeriSeq NIPT Solution v2 puede usarse con un sistema de secuenciación de nueva generación con las especificaciones siguientes:

- Capacidad para 2 × 36 lecturas «paired-end»
- Compatibilidad con adaptadores indexados en VeriSeq NIPT Sample Prep Kit
- Química de dos canales
- Producción automática de archivos BCL (\*.bcl) (datos sin procesar del instrumento de secuenciación)
- 400 millones de lecturas «paired-end» por experimento
- Compatibilidad con VeriSeq NIPT Assay Software v2

NextSeq 550Dx es compatible con VeriSeq NIPT Solution v2

## Análisis de datos de secuencias

Una vez completada la secuenciación, los datos de secuenciación se envían automáticamente a VeriSeq NIPT Assay Software v2, que realiza un análisis y genera un informe. El informe incluye las clasificaciones de cada muestra del lote, así como una evaluación de todos los criterios de medición de CC aplicados. El proceso de análisis de un lote de 48 muestras tarda aproximadamente 4 horas desde que finaliza la secuenciación hasta que se obtienen los resultados finales. Para obtener información detallada sobre análisis de datos y el archivo de resultados, consulte la *VeriSeq NIPT Solution v2 Software Guide (Guía de software de VeriSeq NIPT Solution v2)* (n.º de documento 1000000067940).

## Interpretación de resultados

El algoritmo de VeriSeq NIPT Solution v2 emplea un complejo modelo estadístico que combina distintos tipos de información a partir de la recogida de fragmentos de librería secuenciados con lecturas «paired-end». Este modelo se emplea para detectar regiones del genoma que estén infrarrepresentadas o sobrerrepresentadas en la librería de cada muestra. Lo importante de este modelo es que representa si el grado de infrarrepresentación o sobrerrepresentación detectado es indicador o no, desde el punto de vista cuantitativo, de la existencia de aneuploidías en el genoma fetal al nivel de la fracción fetal estimada para la librería.

En el caso de todos los cromosomas, los datos de secuenciación «paired-end» se alinean con el genoma de referencia (HG19). Las lecturas alineadas no duplicadas exclusivas se añaden en grupos de 100 kb. Los recuentos de grupos correspondientes se ajustan a la tendencia de GC y a la cobertura genómica específica de cada región establecida anteriormente. Con dichos recuentos de grupos normalizados, las puntuaciones estadísticas se derivan de la comparación de las regiones de cobertura que pueden verse afectadas por la aneuploidía con el resto de los autosomas. Se calcula un cociente de verosimilitud logarítmica (LLR, Log Likelihood Ratio) para cada muestra teniendo en cuenta estas puntuaciones basadas en las coberturas y en el cálculo de la fracción fetal. El LLR es la probabilidad de que una muestra se vea afectada por la cobertura observada y la fracción fetal frente a la probabilidad de que una muestra no se vea afectada por la misma cobertura observada. El cálculo de este cociente también tiene en cuenta la incertidumbre estimada en la fracción fetal. En futuros cálculos, se usa el logaritmo natural del cociente. Assay Software evalúa el cociente de verosimilitud logarítmica (LLR) de cada cromosoma objetivo y de cada muestra para determinar las aneuploidías.

Durante la creación del lote, debe definir para cada muestra el tipo de muestra (embarazo de un único embrión o gemelar), el tipo de cribado (básico o del genoma completo) y si se elaborarán o no informes sobre el cromosoma sexual (Yes [Sí], No y SCA [aneuploidía de los cromosomas sexuales]). Juntas, estas opciones determinarán qué información recogerá el informe de cada muestra.

En todos los tipos de muestra, será el tipo de cribado el que determine sobre qué anomalías autosómicas se informará. En el tipo de cribado básico, solo se incluirán en el informe eventos de trisomía cromosómica que afecten a los cromosomas 13, 18 y 21. En el tipo de cribado del genoma completo, se incluirán en el informe las deleciones o duplicaciones cromosómicas parciales o completas de cualquier cromosoma autosómico. Para que una deleción o duplicación parcial se incluya en el informe, su longitud deberá ser como mínimo de 7 Mb. En el caso de muestras de embarazos de un único embrión, puede desactivarse la inclusión en el informe del cromosoma sexual. También puede configurar si desea que en el informe, además de las aneuploidías del cromosoma sexual, se incluya o no información sobre el sexo de las muestras euploides.

En el caso de muestras gemelares, si se selecciona Yes (Sí) para que se incluyan en el informe datos sobre el cromosoma sexual, el resultado se limitará a indicar la presencia o ausencia de un cromosoma Y en la librería. No es posible incluir en el informe datos sobre la aneuploidía del cromosoma sexual para muestras gemelares.

**NOTA** Cuando todas las muestras de un lote tienen el mismo sexo indicado, una notificación de error por correo electrónico/WebUI alertará al usuario con una advertencia de mezcla/contaminación de muestras. El lote se invalidará y no se elaborará ningún informe. (Aplicable para el software de servidor v2.2 y versiones superiores de VeriSeq NIPT Solution v2).

El resultado ANOMALY DETECTED (ANOMALÍA DETECTADA) indica que se han detectado en la muestra una o más anomalías de acuerdo con el tipo de cribado y la opción de informe sobre el cromosoma sexual que se hayan seleccionado. Cuando se detecta una anomalía, el informe proporciona una descripción de esta anomalía con nomenclatura citogenética.

VeriSeq NIPT Assay Software v2 usa estadísticas generadas durante la secuenciación para ofrecer una estimación de la fracción fetal (FFE, Fetal Fraction Estimation) de cada muestra. La FFE es el componente de ADNfc estimado que se recupera en el ensayo y sobre el cual se informa con un porcentaje redondeado para cada muestra. La desviación estándar promedio de esta estimación en todas las muestras es del 1,3 %. La FFE no se debe usar de manera aislada para excluir muestras al generar informes de los resultados.

A fin de realizar llamadas de representación cromosómica, VeriSeq NIPT Assay Software v2 usa la prueba de confianza de aneuploidía fetal individual (iFACT, individualized Fetal Aneuploidy Confidence Test), un criterio de medición de umbral dinámico que indica si el sistema ha generado una cobertura de secuenciación suficiente, basándose en el cálculo de la fracción fetal de cada muestra. Las llamadas negativas se indican solo si la muestra alcanza el umbral de iFACT. Si una muestra no logra alcanzar este umbral, la evaluación de CC muestra FAILED iFACT (iFACT FALLIDA) y el sistema no genera un resultado.

Además de la prueba iFACT, VeriSeq NIPT Assay Software v2 evalúa algunos otros criterios de medición de CC durante el análisis. Entre los criterios de medición se incluyen la evaluación de la uniformidad de cobertura en las regiones genómicas de referencia y la distribución de longitudes de fragmento de ADNfc. La evaluación de CC muestra una marca de CC o un error de CC para cualquier criterio de medición que esté fuera del intervalo admitido. En el caso de que haya un error de CC, el sistema no genera un resultado para la muestra. Si la muestra no supera el CC, puede reprocesarse siempre que haya suficiente volumen de plasma en el tubo de recogida de sangre.

VeriSeq NIPT Solution v2 genera datos que se usan en un informe final. No genera un informe final para el paciente. Los clientes son los responsables del diseño y los contenidos del informe final que se entregará al profesional médico. Illumina no se hace responsable de la precisión de la redacción en el informe final del cliente.



## PRECAUCIÓN

Compruebe las estimaciones de la fracción fetal de todas las muestras. Si los valores son similares para todas las muestras de un mismo experimento, es posible que se haya producido una amalgamación de las muestras que afecte a los resultados. Póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina para que le ayuden a solucionar el problema.

## Características de rendimiento

Los datos siguientes descritos en las secciones de rendimiento clínico y rendimiento analítico se generaron mediante los protocolos y materiales descritos en Instrucciones de uso, empezando por el plasma. Todos los datos de secuenciación de esta sección se generaron en un sistema de secuenciación NextSeq 500/550 o en un sistema de secuenciación NextSeq 550Dx con las configuraciones siguientes:

	NextSeq 500/550	NextSeq 550Dx
Software integrado en el instrumento	NextSeq Control Software 4.0	NextSeq Operating Software 1.3
Reagent Kit Version	NextSeq 500/550 High Output v2.5 (75 cycle) Reagent Kit	NextSeq 550Dx High Output v2.5 (75 cycle) Reagent Kit
Método de secuenciación	Experimento de secuenciación «paired-end» 2 × 36 en modo de rendimiento elevado	Experimento de secuenciación «paired-end» 2 × 36 en modo de rendimiento elevado

## Estudio clínico

La precisión clínica de la solución VeriSeq NIPT v2 se demostró mediante la evaluación de muestras de plasma de mujeres embarazadas con un único embrión y con gemelos. Las muestras se obtuvieron de bancos de muestras de plasma sin identificar que se habían procesado previamente a partir de muestras de sangre completa periférica. Se consideraron más de 45 000 muestras para su inclusión en el estudio. Dichas muestras se sometieron previamente a cribado prenatal para la detección de aneuploidías cromosómicas fetales y deleciones y duplicaciones parciales de 7 Mb o más. Todas las muestras de embarazos afectados, así como un subconjunto de muestras consecutivas de embarazos no afectados, podían ser aptas para la prueba si se disponía de los resultados clínicos y se cumplían los criterios de muestra. El conjunto de análisis para la prueba incluyó un total de 2335 muestras. De este conjunto, 2328 muestras pertenecían a embarazos de un único embrión y siete a embarazos gemelares.

De esas muestras, 28 (el 1,2 %, 28 de 2335) no superaron el CC del ensayo en la primera ronda durante el análisis de los datos secuenciados:

- 27 fallos de iFACT (1 XO, 26 no afectados)
- Un fallo por datos fuera del intervalo previsto

## Características demográficas y de embarazo

La edad de la madre, la edad gestacional y el trimestre del embarazo se resumen en la [Tabla 7](#) para las muestras del cribado del genoma completo, incluidas las muestras de mosaicos conocidos. La mayoría (98 %) de las muestras analizadas corresponden al primer trimestre de embarazo.

Se evaluaron las características demográficas entre las cohortes del cribado básico y el del genoma completo y no se detectó diferencia estadística. Las características demográficas y de embarazo eran similares tanto si se incluían los mosaicos conocidos como si se excluían.

Tabla 7 Demografía y características del embarazo

<b>Resumen estadístico</b>	<b>Genoma completo (incluidos mosaicos conocidos)</b>
Número de muestras	2307*
<b>Edad de la madre: años</b>	
Media	35,08
Desviación estándar	4,04
Mediana	34,95
Percentil 25, percentil 75	32,31, 37,79
Mínimo, máximo	20,22, 53,02
<b>Edad gestacional en el momento de la extracción de sangre: semanas</b>	
Media	10,93
Desviación estándar	1,20
Mediana	10,57
Percentil 25, percentil 75	10,29, 11,14
Mínimo, máximo	10,00, 27,86
<b>Trimestre de embarazo: n (%)</b>	
<Primero (<14 semanas)	2252 (98 %)
Segundo	54 (2 %)
Tercero (≥27 semanas)	1 (0 %)

\*Las muestras finales presentadas incluían 7 gemelos.

## Rendimiento clínico

Los resultados obtenidos con VeriSeq NIPT Solution v2 se compararon con los resultados estándar de la referencia clínica. Todas las muestras del estudio mostraron resultados acordes con los resultados estándar de la referencia clínica (realidad clínica) para aneuploidía cromosómica fetal y deleciones y duplicaciones parciales de 7 Mb o más. El resultado estándar de la referencia clínica para las muestras incluidas en este estudio se basó en los resultados del análisis cromosómico o de un examen físico del recién nacido con un cribado de NIPT negativo basado en NGS. Personal del estudio, debidamente cualificado, realizó la clasificación de los datos estándar de la referencia clínica de acuerdo con el documento de codificación médica del patrocinador.

Entre los métodos de análisis cromosómico se incluyeron el cariotipado, la hibridación in situ de fluorescencia (FISH, Fluorescence In Situ Hybridization) o la microarray cromosómica (CMA, Chromosome Microarray) de hibridación genómica comparativa. El análisis cromosómico se realizó a partir de saliva o sangre periférica de recién nacidos o lactantes, muestras de productos de la concepción (POC, Products Of Conception), amniocitos, vellosidades coriónicas, tejidos placentarios o sangre del cordón umbilical extraída después del nacimiento.

El mosaicismo es la presencia de dos o más líneas celulares de distinta composición cromosómica en un mismo individuo. Las líneas celulares tienen su origen en el mismo cigoto. El tipo y el nivel de mosaicismo varía y depende de cuándo aparezcan los eventos de mosaico durante la embriogénesis y el desarrollo fetal. En los diagnósticos prenatales, aparecen distintos tipos de mosaicismo, dependiendo de la distribución de las líneas celulares anómalas frente a las normales en el citotrofoblasto, el mesénquima o el feto.<sup>10</sup> Si bien el mosaicismo puede apreciarse con cualquier anomalía cromosómica, la prevalencia del mosaicismo en trisomías poco frecuentes es superior en las trisomías de los cromosomas 21, 18 y 13 (T21, T18 y T13).<sup>11</sup> En la evaluación del rendimiento, los casos de mosaicos se incluyeron en el análisis del genoma completo, puesto que en este ensayo el objetivo de este tipo de cribado es la detección de las aneuploidías autosómicas raras (RAA, Rare Autosomal Aneuploidies).

## Rendimiento de cribado básico

En el cribado básico, entre las anomalías se incluyen T21, T18 y T13. El análisis incluyó un total de 2243 muestras de embarazos de un único embrión y gemelares. Se detectó la presencia de T21 en los siete embarazos gemelares; no se reflejan en la siguiente tabla.

Tabla 8 Sensibilidad y especificidad de VeriSeq NIPT Solution v2 para la detección de las trisomías 21, 18 y 13 en el cribado básico para embarazos de un único embrión (excluidos los mosaicos conocidos)

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

El rendimiento del ensayo en el cribado básico, tal y como se muestra en la [Tabla 8](#), se calcula sin incluir un subgrupo de 64 muestras afectadas por RAA, duplicaciones o eliminaciones autosómicas parciales, o mosaicismo conocido. Entre estas 64 muestras, se incluyen tres mosaicos T18 y ocho T21. Se ha identificado que cinco de estas 11 muestras se ven afectadas por la anomalía detectada por VeriSeq NIPT Assay Software v2.

## Rendimiento de cribado del genoma completo

En lo que respecta al cribado del genoma completo, se incluyen en la categoría «Cualquier anomalía» las trisomías, las monosomías y las deleciones o duplicaciones parciales de 7 Mb o más. Las muestras para el cribado del genoma completo incluían 36 muestras con mosaicismo conocido. Se analizó un total de 2307 muestras de embarazos de un único embrión y gemelares. Se detectó la presencia de una anomalía del cromosoma 21 en los siete embarazos gemelares; no se informan en las siguientes tablas.

### Rendimiento del cribado del genoma completo para cualquier anomalía

Tabla 9 Sensibilidad y especificidad de VeriSeq NIPT Solution v2 para la detección de cualquier anomalía en el cribado del genoma completo (incluidos mosaicos conocidos)

	Sensibilidad	Especificidad
% de estimación (n/N)	95,5 % (318/333)	99,34 % (1954/1967)
IC del 95 % bilateral	92,7 %, 97,3 %	98,87 %, 99,61 %

### Rendimiento del cribado del genoma completo para aneuploidía autosómica rara

Tabla 10 Sensibilidad y especificidad de VeriSeq NIPT Solution v2 para aneuploidía autosómica rara (RAA) en el cribado del genoma completo (incluidos mosaicos conocidos)

	Sensibilidad	Especificidad
% de estimación (n/N)	96,4 % (27/28)	99,80 % (2001/2005)
IC del 95 % bilateral	82,3 %, 99,4 %	99,49 %, 99,92 %

### Rendimiento del cribado del genoma completo para deleciones y duplicaciones parciales

Tabla 11 Sensibilidad y especificidad de VeriSeq NIPT Solution v2 para deleciones y duplicaciones parciales de 7 Mb o más en el cribado del genoma completo (incluidos mosaicos conocidos)

	Sensibilidad	Especificidad
% de estimación (n/N)	74,1 % (20/27)	99,80 % (2000/2004)
IC del 95 % bilateral	55,3 %, 86,8 %	99,49 %, 99,92 %

### Diferencias en el rendimiento de los cribados básicos y del genoma completo

La metodología de puntuación de las trisomías comunes y aneuploidías en cromosomas sexuales es la misma tanto para cribados básicos como del genoma completo. El cribado básico solo aplica el algoritmo a las T21, T18 y T13. Por su parte, el cribado del genoma completo va más allá de esta metodología a fin de evaluar todas las trisomías, las deleciones y duplicaciones parciales y RAA.

Existen dos diferencias en la generación de informes de rendimiento descrita entre los cribados básicos y de genoma completo. En primer lugar, en lo que respecta al cribado del genoma completo, se incluyeron en los criterios de medición de rendimiento las muestras con mosaicismo conocido tanto para trisomías comunes como RAA y deleciones y duplicaciones parciales. En segundo lugar, el cribado del genoma completo puede informar de forma preferencial de la detección de una duplicación o deleción parcial en la trisomía completa. La presencia de una trisomía completa, además de una duplicación o deleción parcial, puede apreciarse haciendo referencia a la puntuación de LLR que se proporciona en el informe complementario.

## **Inclusión de mosaicos en cribados del genoma completo**

El mosaicismo se incluye como limitación en este ensayo. De producirse, la señal fetal de una anomalía se reduce y, por tanto, su detección sin poner en peligro la especificidad general del ensayo puede resultar más complicada. Sin embargo, dado que el mosaicismo es más relevante para contenido ampliado, se incluyeron en el cribado del genoma completo las muestras con él.

De las 64 muestras incluidas en el cribado del genoma completo, pero no en el básico, se identificó que 36 contenían mosaicismo según el estándar de referencia clínica. De estas 36 muestras, 23 llamadas coincidieron con el estándar de referencia clínica.

## **Detección de deleciones o duplicaciones parciales frente a aneuploidía del cromosoma completo**

VeriSeq NIPT Solution v2 contiene opciones de menú tanto para cribado básico como para cribado del genoma completo. En el cribado básico, solo se informa sobre un resultado ANOMALY DETECTED (ANOMALÍA DETECTADA) si se detecta una aneuploidía completa en los cromosomas 21, 18 o 13 y si se cumplen todos los criterios de medición del control de calidad. En el cribado del genoma completo, el sistema detecta la aneuploidía en todos los autosomas, así como deleciones y duplicaciones parciales de 7 Mb o más.

Durante el cribado del genoma completo, en los casos en los que tanto un evento cromosómico completo como un evento de CNV dentro del mismo cromosoma superan el umbral de LLR, el sistema da prioridad a informar sobre un evento de deleción o duplicación parcial frente a una llamada del cromosoma completo, si la deleción o duplicación parcial cubre aproximadamente un 75 % o menos del cromosoma en el que se ha detectado el evento. Si la región detectada de deleción y duplicación parcial es superior al 75 % del tamaño del cromosoma, el evento se considerará una trisomía o monosomía completa del cromosoma completo si simultáneamente también se supera el umbral de LLR para todo el cromosoma. Por ello, las deleciones y duplicaciones de un tamaño notable inferiores o iguales al 75 % del tamaño del cromosoma pueden indicar aneuploidía del genoma completo.

En todas las muestras, la puntuación de LLR para la clasificación del genoma completo estará disponible en el informe complementario. La puntuación de LLR deberá revisarse de acuerdo con el valor de corte especificado en la [Figura 2](#), antes de interpretar el resultado. Por ejemplo, en la [Tabla 12](#), puede encontrar un ejemplo de una llamada de CNV en la que las puntuaciones de LLR a nivel cromosómico que superan el valor de corte ofrecen más evidencia para una interpretación compatible con una aneuploidía del cromosoma completo.

En el estudio clínico, hubo dos muestras de embarazo gemelar con duplicaciones notablemente grandes (una en el cromosoma 21 y otra en el cromosoma 18) cuyo tamaño era menor al 75 % del tamaño relativo del cromosoma (consulte la [Tabla 12](#)). En el informe, ambos eventos constaron como duplicaciones parciales en lugar de como una trisomía completa para ese cromosoma. Las puntuaciones de LLR para estos eventos superaban el valor de corte compatible con un resultado afectado de una trisomía completa. Tras una detección de NIPT, tanto en el caso de duplicación parcial como en el de trisomía completa, se ofrece al paciente un seguimiento consistente en una prueba de confirmación mediante diagnóstico prenatal.

Tabla 12 Ejemplos de eventos de duplicación de tamaño grande identificados en el cribado del genoma completo

	<b>Realidad clínica</b>	<b>Resultado del sistema del genoma completo</b>	<b>Tamaño de anomalía (Mb)</b>	<b>% del cromosoma</b>	<b>Puntuaciones de LLR</b>
Muestra 1	Embarazo de un único embrión con trisomía 21	Duplicación parcial en la 21	22,50	48,9	19,43
Muestra 2	Embarazo de un único embrión con trisomía 18	Duplicación parcial en la 18	47,00	60,2	12,99

Consulte la *VeriSeq NIPT Solution v2 Software Guide (Guía de software de VeriSeq NIPT Solution v2)* (n.º de documento 1000000067940) para obtener más información sobre los criterios de medición del control de calidad usados para informar sobre los resultados de aneuploidía.

## Cromosomas sexuales

Los resultados de cromosomas sexuales de VeriSeq NIPT Solution v2 se compararon con los resultados estándar de la referencia clínica y se resumen en la tabla siguiente. Se calculó el porcentaje de concordancia para cada cromosoma sexual, dentro de los resultados estándar de la referencia clínica. El porcentaje de concordancia se calculó como el número de muestras en las que la llamada de cromosomas sexuales de VeriSeq NIPT Solution v2 coincidió con la clasificación estándar de la referencia clínica, dividida entre el número total de muestras con la misma clasificación estándar en la referencia clínica.

Tabla 13 Porcentaje de concordancia para la clasificación del sexo del feto\*

Clasificación del sexo del feto		Fenotipo según examen físico del recién nacido		Resultados citogenéticos							
		Femenino	Masculino	XX	XY	XO	XXX	XXY	XYY	Otros**	Ausente
Anomalía no detectada	XX	997	0	21	0	2	0	0	0	0	0
Anomalía no detectada	XY	0	966	0	15	0	0	0	0	0	1
Anomalía detectada	XO	0	0	0	0	19	0	0	1	0	0
Anomalía detectada	XXX	0	0	0	0	0	17	0	0	1	0
Anomalía detectada	XXY	0	0	0	0	0	0	23	0	1	0
Anomalía detectada	XYY	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0
Total		997	966	21	15	21	17	23	12	2	1
Porcentaje de concordantes		100	100	100	100	90,5	100	100	91,7	No aplicable	No aplicable

\*Cinco embarazos gemelares con presencia de Y se clasificaron correctamente. Dos embarazos sin presencia de Y se clasificaron correctamente.

\*\*Otros resultados citogenéticos fueron XXXXX y XXYY.

## Valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de VeriSeq NIPT Solution v2

El valor predictivo positivo (PPV, Positive Predictive Value) y el valor predictivo negativo (NPV, Negative Predictive Value) de la prueba proporcionan información relativa a su capacidad para informar de decisiones clínicas en función de la sensibilidad de la prueba, su especificidad y la probabilidad de prueba previa de que el feto esté afectado por una trisomía (prevalencia). Dado que los PPV y NPV dependen de la prevalencia y que la prevalencia de estas aneuploidías puede variar entre las diferentes poblaciones objeto, los PPV y NPV se han calculado para un intervalo de valores de prevalencia factibles a partir de la sensibilidad y especificidad observadas en el cribado básico (sin mosaicos conocidos) del estudio de exactitud clínica. La está basada en el cribado del genoma completo (con mosaicos conocidos).

Tabla 14 Prevalencia de trisomía 21, PPV y NPV en cribado básico (excluyendo mosaicos conocidos)

Prevalencia (%)	PPV (%)	NPV (%)
0,05	33,17	>99,99
0,10	49,82	>99,99
0,20	66,53	>99,99
0,50	83,29	>99,99
1,00	90,93	>99,99
1,50	93,79	>99,99
2,00	95,29	>99,99

Tabla 15 Prevalencia de trisomía 18, PPV y NPV en cribado básico (excluyendo mosaicos conocidos)

Prevalencia (%)	PPV (%)	NPV (%)
0,03	23,06	>99,99
0,05	33,31	>99,99
0,10	49,99	>99,99
0,20	66,68	>99,99
0,30	75,03	>99,99
0,40	80,04	>99,99
0,50	83,38	>99,99

Tabla 16 Prevalencia de trisomía 13, PPV y NPV en cribado básico (excluyendo mosaicos conocidos)

Prevalencia (%)	PPV (%)	NPV (%)
0,01	9,10	>99,99
0,02	16,68	>99,99
0,05	33,37	>99,99
0,10	50,05	>99,99
0,20	66,73	>99,99

Tabla 17 Prevalencia de cualquier anomalía, PPV y NPV en cribado del genoma completo (incluyendo mosaicos conocidos)

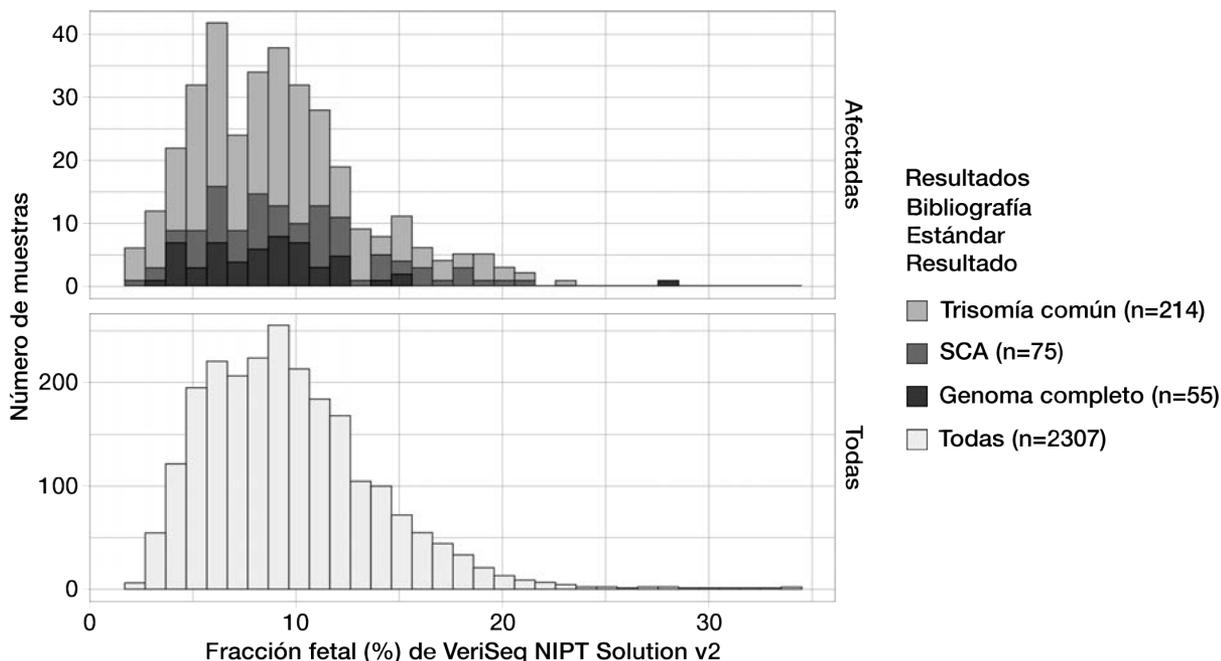
Prevalencia (%)	PPV (%)	NPV (%)
0,01	1,42	>99,99
0,02	2,81	>99,99
0,05	6,74	>99,99

Prevalencia (%)	PPV (%)	NPV (%)
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

## Distribución de la fracción fetal

La distribución de las estimaciones de fracción fetal (FF) de VeriSeq NIPT Solution v2 a partir del cribado del genoma completo con mosaicos se muestra en la categoría «Resultados estándar de la referencia clínica» de la [Figura 1](#).

Figura 1 Distribución de la fracción fetal



5 muestras mostraron anomalías en varias categorías.

Dentro de «Trisomía común», se incluyen muestras con trisomía 21, 18 y/o 13.

Dentro de «Genoma completo», se incluyen muestras con RAA o con deleciones y/o duplicaciones parciales.

Las estimaciones de la FF mostraban un intervalo general de entre el 2 % y el 34 %, con una mediana del 9 % y un intervalo intercuartílico (IQ, InterQuartile) de entre el 6 % y el 12 %. La estimación de la mediana de la FF para las trisomías comunes y los eventos detectados mediante el cribado del genoma completo es del 8 % y para las

SCA es del 9 %. El intervalo en las estimaciones de FF era homogéneo en todos los resultados. No hay desplazamiento evidente en la distribución de la FF entre trisomías comunes, SCA, eventos detectados mediante el cribado del genoma completo o todas las muestras del análisis del genoma completo.

## Rendimiento en embarazos gemelares

### Estimación de la trisomía 13, 18 y 21 y rendimiento del cromosoma Y en embarazos gemelares

Debido a la baja prevalencia de la trisomía 21, 18 y 13 en embarazos gemelares, solo se dispuso de un pequeño número de muestras gemelares afectadas para el estudio clínico. A fin de estimar con mayor precisión el rendimiento de VeriSeq NIPT Solution v2 en embarazos gemelares, se usaron modelos por ordenador basados en observaciones procedentes de muestras clínicas, para simular poblaciones de embarazos gemelares. Esta simulación fue compatible con la población para el uso previsto. Se determinó la distribución de la fracción fetal a partir de aproximadamente 4500 muestras gemelares y se comparó con la distribución de aproximadamente 120 000 muestras de embarazos de un único embrión. Se determinó la distribución de la fracción fetal con aneuploidía a partir de llamadas posiblemente de embarazos de un único embrión (1044 de trisomía 21, 307 de trisomía 18 y 192 de trisomía 13). La combinación de las dos distribuciones permitió inferir la detección de aneuploidía en gemelos. Se simularon juegos de gemelos dicigóticos y monocigóticos y se tomó un promedio ponderado que representara su prevalencia en la población para el uso previsto (2 dicigóticos: 1 monocigótico) para estimar la sensibilidad. A fin de estimar la especificidad, se simularon juegos de gemelos no afectados.

La fracción de cada muestra simulada afectada por trisomía (es decir, la fracción afectada) se calculó de forma distinta para cada categoría de muestra:

- En el caso de los gemelos monocigóticos, la fracción afectada de cada muestra se estableció como 1,0 porque, en esta situación, la trisomía afecta a ambos gemelos.
- En el caso de los gemelos dicigóticos, se asumió que solo uno de los gemelos estaba afectado (es muy improbable que ambos gemelos dicigóticos se vean afectados). Los valores de la fracción afectada se simularon mediante la distribución conocida de los cocientes de fracción fetal según se determina en muestras gemelares clínicas de distinto sexo. Se adoptó un enfoque conservador según el que se asumió que el gemelo afectado siempre tenía la fracción fetal menor de los dos gemelos. Se aplicó un factor de corrección a las fracciones fetales con menor afectación promedio en embarazos con trisomía 13 y 18.
- En el caso de los gemelos no afectados, la fracción afectada de cada muestra se estableció en cero.

En el caso de los gemelos afectados por trisomía 18 o 13, se redujo la fracción fetal correspondiente a la fracción afectada de la muestra. Dicha reducción fue proporcional a la reducción promedio de la fracción fetal observada en los datos clínicos en embarazos de un único embrión con trisomía 18 o 13 frente a embarazos de un único embrión euploide.

Tanto la fracción fetal general como la fracción afectada de cada muestra simulada se usaron, a continuación, para calcular una puntuación de aneuploidía mediante el algoritmo estándar de VeriSeq NIPT Solution v2. La sensibilidad se calculó determinando la frecuencia con la que las puntuaciones de aneuploidía para los

gemelos afectados simulados eran superiores al correspondiente valor de corte de aneuploidía. De manera análoga, a fin de calcular la especificidad, se determinó la frecuencia con la que las puntuaciones de aneuploidía para los gemelos no afectados simulados eran inferiores al correspondiente valor de corte de aneuploidía (Tabla 18). Se estimaron intervalos de confianza del 95 % según el número de muestras gemelares clínicas reales del conjunto de datos original, que se clasificaron como afectados o no afectados por la trisomía en cuestión.

A fin de estimar la sensibilidad del cromosoma Y en muestras gemelares, se simularon juegos de gemelos de XY/XY y XX/XY. Se tomó un promedio ponderado que representara su prevalencia en la población para el uso previsto (1 XY/XY: 1 XX/XY). A fin de estimar la especificidad del cromosoma Y en gemelos, se simuló un juego de gemelos de XX/XX. Los valores de fracción fetal total se simularon de acuerdo con la distribución conocida de la fracción fetal en muestras gemelares clínicas.

En el caso de los gemelos de XY/XY y XX/XY, se estimaron las puntuaciones de cromosoma Y correspondientes usando la relación conocida entre la fracción fetal y las puntuaciones de cromosoma Y en muestras clínicas de un único embrión clasificadas como masculinas. En el caso de los gemelos de XX/XY solo, se simularon los valores de la fracción fetal afectada (es decir, masculina) usando la distribución conocida de los cocientes de fracción fetal observados entre gemelos del mismo embarazo, según determinan las muestras gemelares clínicas de distinto sexo. Se adoptó un enfoque conservador según el que se seleccionó la fracción afectada de forma que correspondiera a la menor de entre los dos gemelos. En el caso de la muestra simulada de XX/XY, se multiplicó la puntuación de cromosoma Y por la fracción afectada.

En el caso de los gemelos de XX/XX, las puntuaciones de cromosoma Y se tomaron a partir de las puntuaciones observadas en muestras clínicas de embarazo de un único embrión clasificadas como femeninas.

La puntuación de cromosoma Y y la fracción fetal general se usaron, a continuación, para clasificar cada muestra simulada según la presencia o ausencia del cromosoma Y, mediante el algoritmo estándar de VeriSeq NIPT Solution v2.

La sensibilidad se calculó determinando la frecuencia con la que los gemelos simulados de XY/XY o XX/XY se clasificaban correctamente como con presencia del cromosoma Y. La especificidad se calculó determinando la frecuencia con la que los gemelos simulados de XX/XX se clasificaban correctamente como con ausencia del cromosoma Y. Se estimaron intervalos de confianza del 95 % según el número de muestras gemelares clínicas reales del conjunto de datos original que se clasificaron como con presencia del cromosoma Y o con ausencia del cromosoma Y.

Tabla 18 Estimaciones para la trisomía 21, 18 y 13 en población simulada de embarazos gemelares

	<b>Trisomía 21</b>	<b>Trisomía 18</b>	<b>Trisomía 13</b>	<b>Presencia de Y</b>
Sensibilidad	96,4 %	95,7 %	93,6 %	>99,9 %
IC del 95 % bilateral	(86,4 %, 98,9 %)	(68,3 %, 99,4 %)	(64,1 %, 98,9 %)	(99,9 %, >99,9 %)
Especificidad	99,9 %	>99,9 %	>99,9 %	>99,9 %
IC del 95 % bilateral	(99,8 %, >99,9 %)	(99,9 %, >99,9 %)	(99,9 %, >99,9 %)	(99,7 %, >99,9 %)

La [Tabla 18](#) proporciona las estimaciones puntuales y los intervalos de confianza estimados del 95 % para la sensibilidad y la especificidad de VeriSeq NIPT Solution v2 para detectar las trisomías 21, 18 y 13 y la presencia de Y en una población simulada de embarazos gemelares compatible con la población para el uso indicado. Los intervalos de confianza se estimaron según el número de muestras gemelares clínicas que superaron el CC clasificadas como afectadas o no afectadas por la trisomía correspondiente. En el cálculo de sensibilidad se presupone que dos tercios de los embarazos gemelares afectados son dicigóticos con un gemelo afectado, mientras que un tercio de los embarazos gemelares afectados son monocigóticos con ambos gemelos afectados.

Las estimaciones que figuran en la [Tabla 18](#) corresponden solo a embarazos gemelares. Debido a que su prevalencia es aún menor, los datos de embarazos múltiples de orden superior (trillizos o más) fueron insuficientes para establecer modelos estadísticos adecuados para estimar la precisión de la detección de la aneuploidía.

## Rendimiento analítico

### Precisión

A fin de evaluar y cuantificar la precisión del ensayo, se llevó a cabo un nuevo análisis de los datos mediante el software de procesos de análisis de VeriSeq NIPT Solution v2, a partir de dos estudios previos con VeriSeq NIPT Solution:

- Un estudio de reproducibilidad descentralizado, que incluyó tres experimentos realizados por tres operadores en tres centros usando un único lote de reactivos para un total de nueve experimentos.
- Un estudio de precisión dentro de un mismo laboratorio, que incluyó 12 experimentos en un único centro usando dos plataformas ML STAR, dos sistemas de instrumento de secuenciación y tres lotes de reactivos de secuenciación.

El objetivo del estudio de precisión era cuantificar la precisión del ensayo respecto a la trisomía 21 (T21) y al cromosoma Y, así como estimar la variabilidad entre distintos instrumentos, kits de preparación de librerías y lotes de reactivos de secuenciación. La reproducibilidad de condiciones no descritas anteriormente no se evaluó como parte de los estudios.

Se creó un grupo de T21 con el 5 % de fracción fetal mediante la combinación de ADNfcl extraído de plasma materno de mujeres embarazadas (con feto afectado por T21) y ADNfcl extraído del plasma de mujeres no embarazadas. También se creó un grupo de ADNfcl materno de feto masculino (XY) con el 10 % de fracción fetal. El panel de muestras para cada estudio y para cada experimento incluyó 4 réplicas del grupo de muestras afectadas por T21 con el 5 % de fracción fetal y 20 réplicas del grupo de ADNfcl materno de feto masculino con el 10 % de fracción fetal. Se realizaron pruebas durante 10 días con un total de 21 experimentos en los dos estudios combinados.

En la evaluación, se eligieron la detección de la T21 y la presencia del cromosoma Y por la representatividad de las afecciones clínicas y la complejidad de la detección de la anomalía. Puesto que se trata del autosoma humano más pequeño, el tamaño del cromosoma 21 tiene un impacto directo sobre la sensibilidad de la detección de la T21, especialmente con valores bajos de fracción fetal, como los usados en este estudio. El cromosoma Y, como se presenta en el plasma materno, es en origen exclusivamente fetal y, por lo tanto, más fácil de detectar en el ensayo.

Las desviaciones media y estándar observadas para la puntuación del LLR del cromosoma 21 y los valores cromosómicos normalizados (NCV, Normalized Chromosomal Values) del cromosoma Y mostraron que la desviación estándar (SD, Standard Deviation) de réplica fue la mayor fuente de variabilidad. La variación entre centros, instrumentos y lotes de reactivos añadió una variabilidad insignificante, como evidencia la diferencia entre SD total y SD de réplica que figuran en la [Tabla 19](#) y la [Tabla 20](#).

**Tabla 19** Resumen de desviación estándar (SD) de respuesta de secuenciación en estudio descentralizado (reproducibilidad)

Respuesta	N	Media	SD de réplica	SD total de reproducibilidad*
Puntuación del LLR del cromosoma 21	36	34,43	11,36	11,36
NCV del cromosoma Y	180	190,56	7,96	10,20

\*El total incluye la variabilidad debida al centro, al operador, al experimento, al día y a la réplica.

**Tabla 20** Resumen de precisión de respuesta de secuenciación en un mismo laboratorio

Respuesta	N	Media	SD de réplica	SD total en un mismo laboratorio*
Puntuación del LLR del cromosoma 21	48	36,01	9,07	10,25
NCV del cromosoma Y	240	198,68	7,63	7,82

\*El total incluye la variabilidad debida al instrumento de secuenciación, al lote de reactivos, al operador, al experimento, al día y a la réplica.

Se llevó a cabo un estudio adicional para comparar la precisión de secuenciación de VeriSeq NIPT Solution v2 (desviación estándar total) usando la versión 2.0 de una celda de flujo en comparación con la versión 2.5. El estudio incluyó dos tipos de celdas de flujo (v2.0 y v2.5), tres lotes de kits de secuenciación, cuatro sistemas de instrumentos y dos experimentos de secuenciación por combinación para un total de 48 experimentos en un único centro. Se preparó un grupo de secuenciación para placas de ADNflc preparadas manualmente. El panel de muestras incluyó 4 réplicas del grupo de muestras afectadas por T21 con el 5 % de fracción fetal y 20 réplicas del grupo de ADNflc materno de feto masculino (XY) con el 10 % de fracción fetal. Los resultados del estudio se presentan en la [Tabla 21](#) y confirman que no hay diferencias en lo que se refiere a la precisión de la secuenciación si se usan celdas de flujo v2.0 o celdas de flujo v2.5.

Tabla 21 Resumen de precisión de respuesta de secuenciación en celdas de flujo v2.0 en comparación con celdas de flujo v2.5

Respuesta	Número de observaciones por versión	SD total de v2.0*	SD total de v2.5*	Resultado estadístico**
Puntuación del LLR del cromosoma 21	96	9,56	8,44	Significación estadística (valor de-p = 0,25)
NCV del cromosoma Y	480	7,74	7,38	Significación estadística (valor de-p = 0,38)

\*El total incluye la variabilidad debida al instrumento de secuenciación, al lote de reactivos, al experimento, al día y a la réplica

\*\*Basado en la prueba F para determinar la igualdad de varianzas (cuadrado de la desviación estándar)

## Contaminación cruzada

Se evaluó la contaminación cruzada en el flujo de trabajo de preparación de muestras de VeriSeq NIPT Solution. Se analizaron grupos de plasma de mujeres no embarazadas (XX) y hombres adultos (XY) en un patrón de damero con el formato de placas de 96 pocillos en 4 placas. N = 48 cada una para muestras de mujeres y hombres por placa, para un total de 192 muestras femeninas y 192 muestras masculinas. Ninguna de las muestras femeninas mostró una cobertura de cromosoma Y que fuera estadísticamente superior a la del contexto estimado, lo que indica una ausencia de contaminación cruzada de muestras masculinas dentro de la misma placa. No se observó contaminación cruzada detectable en VeriSeq NIPT Solution.

## Sustancias potencialmente interferentes

Mediante VeriSeq NIPT Solution, se evaluó el efecto de sustancias potencialmente interferentes, analizando el rendimiento del ensayo en presencia de dichas sustancias.

Se introdujo albúmina, bilirrubina, hemoglobina y triglicéridos (endógenos) en los grupos de plasma materno de embarazos de feto femenino (XX) no afectados. Se analizaron con dos concentraciones por cada sustancia de prueba (n=16 para cada una). No se observaron interferencias en el rendimiento del ensayo.

Tabla 22 Sustancias potencialmente interferentes (endógenas)

Sustancia de prueba	Concentración de prueba baja (mg/ml)	Concentración de prueba elevada (mg/ml)
Albúmina	35	50
Bilirrubina	0,01	0,15
Hemoglobina	100	200
Triglicéridos	1,5	5

El ADN genómico (ADNg) materno presente de manera natural en el plasma también puede interferir potencialmente en el rendimiento del ensayo, ya que se puede extraer junto con el ADN fetal libre circulante. Se añadieron niveles de ADN genómico de 1,6 ng, 3,3 ng y 4,9 ng por muestra (que se corresponden con una desviación estándar de 1, 2 y 3 sobre la media prevista de concentración de ADN genómico tras 7 días de almacenamiento de sangre completa<sup>12</sup>) al ADNflic extraído del plasma materno de embarazos de feto femenino (XX) no afectados. A continuación, las muestras se analizaron en VeriSeq NIPT Solution (n=16 para cada concentración). No se observaron interferencias en el rendimiento del ensayo en presencia de niveles elevados de ADNg.

Se analizaron veinte medicamentos potencialmente interferentes (exógenos) que se toman o recetan habitualmente durante el embarazo conforme a EP7-A2 (Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline; 2.ª edición). Los 20 medicamentos potencialmente interferentes se combinaron en cuatro grupos, se introdujeron en el plasma materno de embarazos de feto femenino (XX) no afectados y se probaron en VeriSeq NIPT Solution (n=16 para cada grupo). No se observaron interferencias en el rendimiento del ensayo en presencia de estas sustancias exógenas.

Tabla 23 Sustancias potencialmente interferentes (exógenas)

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
Paracetamol	Difenhidramina	Salbutamol	Cetirizina
Acetilcisteína	Eritromicina	Bupropión	Dextrometorfano
Bisoprolol	Guaifenesina	Cafeína	Ácido L-ascórbico
Citalopram	Heparina	Sertralina	Metoprolol
Desloratadina	Lidocaína	Fluoruro de sodio	Nadolol

## Límite de detección

El límite de detección (LOD, Limit Of Detection) se define como el nivel de fracción fetal que corresponde a la probabilidad de detección del 95 % de una afección de interés, como la T21. A fin de evaluar el LOD de VeriSeq NIPT Solution v2 para distintas afecciones frecuentes, se han realizado varios estudios y análisis estadísticos.

La probabilidad de detectar una afección de interés en una muestra afectada procesada mediante VeriSeq NIPT Solution v2 depende fundamentalmente de tres factores:

- Fracción fetal
- Profundidad de secuenciación
- Tamaño y complejidad de la región genómica de interés

Si se asume una profundidad de secuenciación constante, es más fácil detectar una anomalía determinada en muestras que tengan un porcentaje de fracción fetal mayor que en muestras que tengan un porcentaje de fracción fetal menor. Y viceversa: si se asume una fracción fetal constante, es más fácil detectar una anomalía determinada en muestras que tengan una profundidad de secuenciación mayor que en muestras que tengan una profundidad de secuenciación menor. Por último, es más difícil detectar anomalías en regiones genómicas más pequeñas o más complejas que en regiones genómicas más grandes o menos complejas, si se asumen una fracción fetal y una profundidad de secuenciación constantes.

A fin de determinar el LOD para la detección de la T21, se analizaron muestras que incluían mezclas de muestras con T21 agrupadas y muestras no afectadas agrupadas. Los dos tipos de analitos se mezclaron en series de valoración para crear un juego de siete niveles de fracción fetal (0, 2, 3, 4, 5, 6 y 10 %). Cada nivel se representó mediante un total de 10 réplicas.

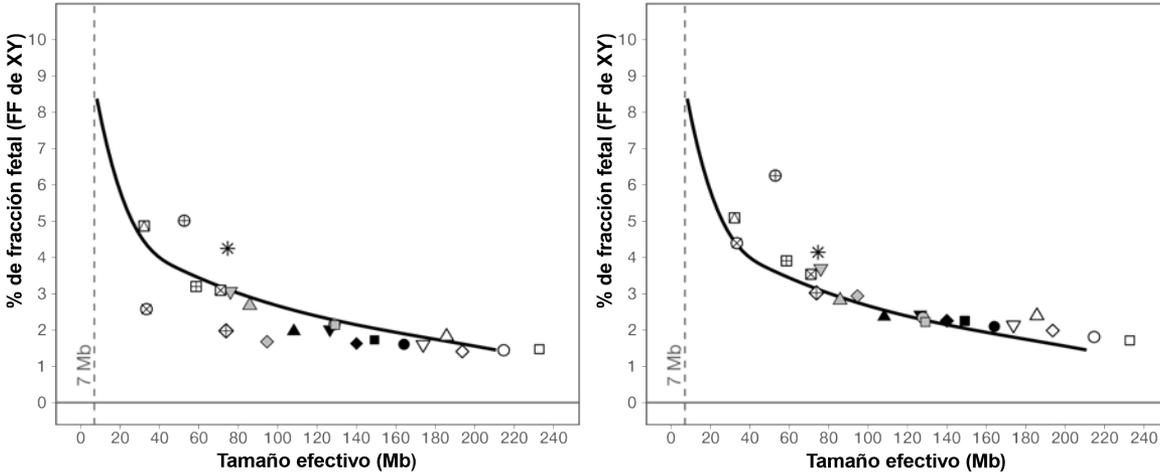
A fin de aumentar adicionalmente la resolución de la cuadrícula de fracción fetal para el análisis del LOD, a los datos de este estudio se han añadido datos obtenidos a partir de una dilución por ordenador. Los efectos de la dilución y valoración experimentales se simularon mediante una mezcla controlada de datos de secuenciación. Los datos de esta valoración por ordenador abarcaban un juego de 14 niveles de fracción 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 y 4,50 %) con 32 réplicas para cada nivel. Se aplicó un análisis probit a los datos resultantes para determinar el LOD de T21.

De manera independiente, se desarrolló un modelo estadístico para predecir, mediante las fracciones fetales, la profundidad de secuenciación y el tamaño/complejidad genómica, la probabilidad de detección de cualquier anomalía en cualquier muestra. Se estableció dicho modelo a partir de los datos correspondientes a un juego de 1405 muestras de XY. Se determinó que el LOD de T21, según predecía dicho modelo, concordaba con la estimación basada en probit descrita anteriormente. Se usó este modelo estadístico para estimar los valores del LOD de aneuploidías en todos los autosomas y en deleciones y duplicaciones parciales.

La [Figura 2](#) muestra la probabilidad de detección del 95 % para regiones promedio por tamaño y los límites autosómicos de la detección de todas las trisomías y monosomías. Valor de corte de LLR de CNV de 15,1.

Figura 2 Probabilidades de detección del 95 % para regiones promedio por tamaño, para VeriSeq NIPT Solution v2

Los símbolos muestran el límite de detección autosómico para trisomías Los símbolos muestran el límite de detección autosómico para monosomía:



Cr	Símbolo	Trisomía		Monosomía	
		Valor de corte de LLR	LoD (%)	Valor de corte de 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	Trisomía		Monosomía	
		Valor de corte de LLR	LoD (%)	Valor de corte de 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

# Solución de problemas

## Solución de problemas de VeriSeq NIPT Solution v2

Tipo de fallo	Resultado posible	Interpretación	Medida recomendada	Comentarios
Entrada insuficiente de plasma	Error de CC de muestra	Volumen de plasma insuficiente.	Vuelva a extraer la muestra.	Según inspección visual de volumen de plasma.
Fallo de tubo de sangre	Sin separación de sangre en capas	Muestra no centrifugada.	Asegúrese de que se inició el centrifugado y de que el tubo se centrifugó con la fuerza correcta. Vuelva a extraer la muestra.	
		Transporte o almacenamiento incorrecto de la muestra (hemólisis de la muestra).	Vuelva a extraer la muestra.	Las muestras congeladas no se separan. Un transporte o almacenamiento incorrectos pueden provocar la hemólisis de las muestras.

Tipo de fallo	Resultado posible	Interpretación	Medida recomendada	Comentarios
Obstrucción en muestra o flujo lento	Contaminación del plasma	Las muestras individuales pueden obstruir la placa de unión si hay contaminación suficiente en la muestra de plasma.	Inspeccione la muestra. Si el plasma que queda en el tubo es de color rojo o lechoso, cancele la muestra y solicite una nueva extracción. Si el aspecto de la muestra es normal, repita la prueba de la muestra.	
	Desbordamiento de muestra	Inspección visual inadecuada de cada tubo para determinar la idoneidad de la muestra.	Invalide las muestras de pocillos cercanos afectados por el desbordamiento.	Podría indicar que las muestras se transportaron o almacenaron incorrectamente antes de su procesamiento. Las muestras no aptas deben descartarse del procesamiento.
	Fallo de hardware	Absorción inadecuada de la muestra durante la extracción.	Repita la prueba de la muestra. Si el problema persiste en otros pocillos con otras muestras, póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.	

Tipo de fallo	Resultado posible	Interpretación	Medida recomendada	Comentarios
Error de CC de análisis de muestra individual	Error de CC de secuenciación	<p>Las posibles causas son las siguientes:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Entrada genética insuficiente</li> <li>Transferencia errónea durante la manipulación de la muestra</li> <li>Fallo de reactivo de secuenciación</li> </ul>	Compruebe la anotación de la muestra. Compruebe si ha habido un rendimiento similar en muestras anteriores con posiciones de placa relacionadas. Repita la prueba de la muestra.	Indica una entrada de muestras insuficiente o un error de transferencia de ML STAR. El material genético insuficiente puede deberse a la escasez de ADN fetal libre circulante en el plasma o a que el ADN con células provoque una dilución de la muestra excesiva para la secuenciación.
	Recuento bajo de FF o sitios no excluidos (NES, Non-Excluded Sites)	No se han generado datos suficientes para elaborar un informe preciso.	Repita la prueba del plasma.	

Tipo de fallo	Resultado posible	Interpretación	Medida recomendada	Comentarios
Error de CC de cuantificación	Error de ejecución de la cuantificación. Mediana del lote por debajo del mínimo	Rendimiento del proceso insuficiente.	Repita la cuantificación. Si la repetición da error, póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.	Los criterios de medición de las curvas estándar que no se superan indican problemas con la preparación de librerías (es decir, uso de etanol de calidad no biológica) o problemas con el proceso de cuantificación.
	Error de ejecución de la cuantificación	Fallo de curva estándar.	Repita la cuantificación. Si la repetición da error, póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.	
Error de agrupación	Error al realizar la agrupación de la muestra	El análisis de agrupación no puede calcular los volúmenes correctos de los grupos.	Vuelva a evaluar la concentración de los grupos objetivo. Vuelva a ejecutar el análisis de agrupación.	

## Solución de problemas de VeriSeq NIPT Microlab STAR

Paso del proceso	Código de error	Cuadro de diálogo de error	Descripción	Solución
Creación de lotes	EM0044	El ID de lote introducido contiene caracteres no permitidos.	VeriSeq NIPT Solution v2 solo admite números, letras, guiones bajos y guiones medios en los campos de datos.	Cambie el nombre del lote con un nombre que no contenga caracteres especiales.

Paso del proceso	Código de error	Cuadro de diálogo de error	Descripción	Solución
Creación de lotes	EM0051	El ID de lote supera los 36 caracteres.	VeriSeq NIPT Solution v2 tiene un límite de 36 caracteres para los nombres de lote.	Cambie el nombre del lote con un nombre de menos de 36 caracteres.
Creación de lotes	EM0076	No es posible conectar con VeriSeq Onsite Server v2.	VeriSeq Onsite Server v2 no responde a las solicitudes de datos de Workflow Manager.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Asegúrese de que ML STAR está conectado a la red.</li> <li>2. Asegúrese de que VeriSeq Onsite Server v2 está encendido.</li> <li>3. Compruebe que ML STAR se puede conectar a VeriSeq Onsite Server v2 (mediante solicitud de ping).</li> <li>4. Si los pasos anteriores no resuelven el problema, póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.</li> </ol>
Creación de lotes	EM0118	Este lote ha fallado y no se puede seguir procesando.	El lote especificado ya ha fallado y no se puede seguir procesando.	El registro del lote de VeriSeq Onsite Server v2 indica que el lote seleccionado ha fallado. No se puede seguir procesando. Cree otro lote con las muestras necesarias.
Creación de lotes	No aplicable	Este lote ya ha completado el procesamiento. ¿Quiere volver a crear un grupo?	El lote indicado se ha procesado mediante agrupación. El único procesamiento permitido es volver a crear un grupo.	Vuelva a crear un grupo de la siguiente manera. <ul style="list-style-type: none"> <li>• Seleccione <b>Re-Pool</b> (Volver a crear un grupo).</li> <li>• Anule el método y asegúrese de que el nombre del lote es correcto antes de volver a crear un grupo.</li> </ul>

Paso del proceso	Código de error	Cuadro de diálogo de error	Descripción	Solución
Aislamiento del plasma	WP0087	Se han cargado códigos de barras de muestras por duplicado.	En el sistema, hay cargadas muestras con códigos de barras idénticos.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Siga las indicaciones de Workflow Manager para identificar las muestras duplicadas.</li> <li>2. Elimine las muestras duplicadas y vuelva a etiquetarlas o sustitúyalas.</li> <li>3. Vuelva a cargar las muestras.</li> </ol>
Aislamiento del plasma	EP0102	Las muestras especificadas en la hoja de muestras no se han cargado.	Hay muestras incluidas en la hoja de muestras que no se han incluido en los códigos de barras cargados.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Siga las indicaciones de Workflow Manager para identificar las muestras que faltan.</li> <li>2. Realice una de las siguientes acciones: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Añada al lote las muestras que faltan y vuelva a cargar las muestras.</li> <li>• Anule el método y modifique la hoja de muestras, según sea necesario. Reinicie el método.</li> </ul> </li> </ol>
Carga de placas	No aplicable	Error de máscara de código de barras Venus	Workflow Manager se encarga de aplicar la asociación correcta entre placa y lote mediante máscaras de código de barras Venus.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Compruebe la ubicación de las placas para confirmar que su disposición sea correcta.</li> <li>2. Asegúrese de que la placa cargada es la correcta para el lote indicado.</li> </ol>

Paso del proceso	Código de error	Cuadro de diálogo de error	Descripción	Solución
Extracción del ADNfic	WE0150	La presión de la cámara de vacío es demasiado baja.	Workflow Manager no continúa si el sensor de presión de la línea de vacío en reposo es <400 torr.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Compruebe si la línea de vacío está retorcida u obstruida.</li> <li>2. Abra las pinzas de desconexión del conducto de residuos, deje que se reduzca la presión y, a continuación, cierre de nuevo las pinzas.</li> <li>3. Asegúrese de que el controlador de vacío y la bomba estén encendidos.</li> <li>4. Compruebe la botella de residuos al vacío. Si la botella de residuos está llena hasta más de la mitad, vacíela.</li> <li>5. Si el problema persiste, póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.</li> </ol>
Extracción del ADNfic	WE0153	La presión de la cámara de vacío es demasiado alta.	Si la presión de la cámara de vacío es demasiado alta antes de iniciar el control de presión, puede que haya algún fallo en el sistema.	Revise si, en la parte trasera del controlador, están bien colocados todos los conductos de vacío y todas las conexiones.

Paso del proceso	Código de error	Cuadro de diálogo de error	Descripción	Solución
Extracción del ADNflic	WE0996	Junta de vacío errónea.	Debe solucionarse el problema del sello para poder continuar.	<p>Verifique que se ha solucionado el problema del sello antes de hacer clic en <b>OK</b> (Aceptar).</p> <ol style="list-style-type: none"><li>1. Asegúrese que la placa de unión se ha lavado en el distribuidor de vacío. Póngase un guante y presione la placa de unión con fuerza.</li><li>2. Escuche el ruido del vacío y observe el flujo de agua que atraviesa la placa de unión.</li><li>3. Abra la vista de rastreo en Workflow Manager. Cuando la lectura real de la presión alcance las 50 unidades de presión por debajo de la lectura ambiental, haga clic en <b>OK</b> (Aceptar) para continuar con la extracción de ADN fetal libre circulante.</li><li>4. Si la lectura de presión requerida no se alcanza durante el tiempo asignado, haga clic en <b>OK</b> (Aceptar) para continuar con la primera carga de lisado.</li><li>5. Pause el método después de que el lisado se haya dispensado en la placa de unión. Vuelva a colocarlo y presione la placa de unión con fuerza.</li><li>6. Si el lisado no fluye a través de la placa, póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.</li></ol>
Extracción del ADNflic	WM0219	Si el vacío está activado, detenga la bomba manualmente.	El vacío puede permanecer activo tras anular un método durante la extracción.	<ol style="list-style-type: none"><li>1. En el controlador de vacío, pulse el botón <b>Power</b> (Encendido) para apagar el vacío.</li><li>2. Espere 10 segundos y pulse de nuevo el botón <b>Power</b> (Encendido) para apagar el vacío.</li></ol>

Paso del proceso	Código de error	Cuadro de diálogo de error	Descripción	Solución
Extracción del ADNflc	EE0477	Se ha producido un error durante el desplazamiento de una placa. (Error de iSWAP)	Si se detecta un error de iSWAP (se ha caído la placa, no se ha podido recoger, etc.), el sistema le indica que termine de mover la placa manualmente.	Asegúrese de que la placa se puede recuperar (no se ha derramado material). <ul style="list-style-type: none"> <li>• Si la placa no se puede recuperar, anule el experimento.</li> <li>• Si la placa se puede recuperar, siga las instrucciones mostradas para realizar la transferencia de la placa manualmente.</li> </ul>
Extracción del ADNflc	EE0519	Los códigos de barras escaneados no coinciden con el código de barras de la placa de unión registrado.	La placa de unión cargada no coincide con el código de barras de la placa quitada.	Asegúrese de que la placa que está en proceso de carga coincide con el código de barras registrado (consulte el registro de rastreo para comprobar el código de barras previsto).

Paso del proceso	Código de error	Cuadro de diálogo de error	Descripción	Solución
API	EA0372	No es posible conectar con el servidor de datos.	VeriSeq Onsite Server v2 no responde a las solicitudes de datos de Workflow Manager.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Asegúrese de que ML STAR está conectado a la red.</li> <li>2. Asegúrese de que VeriSeq Onsite Server v2 está encendido.</li> <li>3. Compruebe que ML STAR se puede conectar a VeriSeq Onsite Server v2 (mediante solicitud de ping).</li> </ol>
	EA0774	Error de conexión. No se ha podido validar la conexión con el servidor de la API.	VeriSeq Onsite Server v2 ha dejado de responder a las solicitudes de datos de Workflow Manager.	<p>Compruebe lo siguiente:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Asegúrese de que ML STAR está conectado a la red.</li> <li>2. Compruebe que ML STAR se puede conectar a VeriSeq Onsite Server v2 (mediante solicitud de ping).</li> <li>3. Asegúrese de que VeriSeq Onsite Server v2 está encendido.</li> </ol>
	EA0780	403: Solicitud no válida La transacción actual no es válida.	Los datos enviados no cumplen la lógica del flujo de trabajo del sistema.	Consulte los detalles del error para obtener más información. Este error suele deberse a un exceso de caracteres o al uso de caracteres no permitidos.

## Bibliografía

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. Nueva 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, Nicolaidis KH. Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for fetal aneuploidies: updated meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2017 Apr 11. doi: 10.1002/uog.17484.
6. Bianchi D, Parker R, Wentworth J et al. DNA Sequencing Versus Standard Prenatal Aneuploidy Screening. *N Engl J Med.* 2014;370(9):799-808. doi:10.1056/nejmoa1311037.
7. Benn P, Borrell A, Chiu RW, et al. "Position statement from the Chromosome Abnormality Screening Committee on behalf of the Board of the International Society for Prenatal Diagnosis." *Prenat Diagn* 35 (2015): 725-34.
8. Gregg AR, Skotko BG, Benkendorf JL, et al. Noninvasive prenatal screening for fetal aneuploidy, 2016 update: a position statement of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genet Med.* 2016; doi:10.1038/gim.2016.97.
9. Dondorp W, de Wert G, Bombard Y, et al. Non-invasive prenatal testing for aneuploidy and beyond: challenges of responsible innovation in prenatal screening. *Eur J Hum Genet.* 2015 Nov;23(11):1438-50.
10. Grati, et al. "Fetoplacental mosaicism: potential implications for false-positive and false-negative noninvasive prenatal screening results." *Genetics in Medicine* 16 (2014): 620-624.
11. Wellesley, et al. "Rare chromosome abnormalities, prevalence and prenatal diagnosis rates from population-based congenital anomaly registers in Europe." *European Journal of Human Genetics* 20 (2012): 521-526.
12. Norton S, Lechner J, Williams T, Fernando M et al. A Stabilizing Reagent Prevents Cell-free DNA Contamination by Cellular DNA in Plasma During Blood Sample Storage and Shipping as Determined by Digital PCR. *Clin. Biochem.* 2013;46: 1561-1565. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2013.06.002.
13. Bianchi D W, et al. "Genome-wide fetal aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing." *Obstet Gynecol* 119 (2012): 890-901.
14. Ehrich M, et al. "Genome-wide cfDNA screening: clinical laboratory experience with the first 10,000 cases." *Genet Med* 19 (2017): 1332-1337.
15. Fiorentino F, et al. "The clinical utility of genome-wide cfDNA screening." *Prenat Diagn* 37 (2017): 593-601.

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

## Historial de revisiones

Documento	Fecha	Descripción del cambio
N.º de documento 1000000078751 v09	Abril de 2024	<p>Eliminado</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>N.º de referencia 20030577 obsoleto.</li> <li>Necesidad máxima de capacidad de tubos para la centrifugadora de tubos de recogida de sangre.</li> </ul> <p>Añadido</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Nuevo n.º de referencia 20101927 de VeriSeq Onsite Server v2.</li> <li>Unidad de medida para los tubos de recogida de sangre de 10 ml.</li> <li>Aclaración sobre las versiones compatibles de SoftMax Pro.</li> <li>Nota aclaratoria para indicar que solo debe utilizarse material de plástico compatible para garantizar la compatibilidad con VeriSeq NIPT Microlab STAR.</li> <li>Nota sobre la advertencia de contaminación de la mezcla de la muestra en la sección Interpretación de los resultados.</li> <li>Declaración de advertencia de no congelar la muestra de sangre completa recogida en Streck Cell-Free DNA BCT.</li> <li>Declaración de advertencia para evitar exponer la muestra a temperaturas elevadas.</li> <li>Aclaración relativa a las limitaciones del ensayo y las condiciones de reproducibilidad.</li> <li>Aclaración sobre el valor de corte de LLR de CNV en la figura 2 de la sección Límite de detección.</li> </ul> <p>Actualización</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Cambio de referencia de cubeta de reactivos compatible de la cubeta de reactivos de Roche a la cubeta de reactivos de Illumina y adición de un nuevo número de referencia.</li> <li>Cambio del n.º de referencia de Thermo Fisher Multifuge X4 Pro-MD a 75016034.</li> <li>Declaración de precaución de que los volúmenes de pocillos irregulares pueden hacer que las muestras no superen el CC automatizado.</li> <li>Referencia a las instrucciones de uso del instrumento.</li> </ul>

Documento	Fecha	Descripción del cambio
N.º de documento 1000000078751 v08	Agosto de 2022	Actualización del Número de referencia del flujo de trabajo Eliminación de la instrucción de pipetear para mezclar si la placa de librería se había congelado.
N.º de documento 1000000078751 v07	Mayo de 2022	Separar las limitaciones del procedimiento en el informe VeriSeq NIPT Solution v2 e incluir los dos primeros puntos. El resto del texto se ubica en un nuevo encabezado de Limitaciones del ensayo. Eliminado <ul style="list-style-type: none"> <li>• VeriSeq de todos los nombres de reactivos.</li> <li>• Aplicar un código de barras de placa a la placa adaptadora de VeriSeq NIPT en la preparación de librerías.</li> </ul> Añadido <ul style="list-style-type: none"> <li>• La palabra «certificado» al agua sin ARNasa ni DNasa.</li> <li>• Uno de los siguientes lectores de microplacas o equivalentes y SpectraMax M2, M3, M4, M5 y nota.</li> <li>• A la sección VeriSeq NIPT Microlab STAR para explicar qué hacer durante un evento de manipulación de errores.</li> <li>• Una nota para inspeccionar visualmente los pocillos.</li> <li>• Instrucciones para los lotes de 24 y 48 muestras en todas las secciones del protocolo.</li> <li>• Pasos para saber cuándo utilizar la placa adaptadora violeta o equivalente.</li> <li>• Redacción de la sección Demografía y características del embarazo para incluir los resultados del primer trimestre de embarazo.</li> <li>• Un punto para las especificaciones de la placa de pocillos profundos para incluir la resistencia a la torsión.</li> </ul> Actualización
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Redacción para aclarar los nombres de lotes únicos e incluir un ejemplo.</li> <li>• Símbolos y formato de las notas, avisos y advertencias.</li> <li>• Subapartados de Resultados del ensayo</li> <li>• Tiocianato de guanidina a clorhidrato de guanidina.</li> <li>• CVS a BVS (sistema de vacío básico)</li> <li>• Redacción sobre el uso del cribado de todo el genoma y la puntuación de LLR.</li> <li>• Especificaciones: Especificaciones de la cubeta de reactivos, las placas de pocillos profundos, las placas de 384 pocillos y las placas de 96 pocillos</li> </ul>

Documento	Fecha	Descripción del cambio
N.º de documento 1000000078751 v06	Agosto de 2021	Se modificó la dirección del representante autorizado en la UE.
N.º de documento 1000000078751 v05	Diciembre de 2020	<p>Se han actualizado las secciones Principios de procedimiento, Advertencias y precauciones y Etiquetado de productos con aclaraciones adicionales para cumplir los requisitos normativos. Se han hecho actualizaciones menores en el contenido del protocolo para adaptarlo al estilo y la organización actuales de Illumina.</p> <p>Se ha corregido la descripción del cromosoma 21 de «segundo autosoma humano más pequeño» a «autosoma humano más pequeño» en el apartado Precisión de la sección Rendimiento analítico.</p> <p>Se han añadido enunciados de precaución para abordar el uso inadecuado de los depósitos y el riesgo de amalgamación de muestras en el apartado Preparación de la sección Aislamiento de plasma y en la sección Interpretación de resultados.</p> <p>Se han añadido nuevos números de referencia de servidor y software para el lanzamiento de un nuevo modelo de servidor y las actualizaciones del número de referencia del software.</p> <p>Se han añadido precauciones al protocolo, además de información sobre la solución de problemas para abordar y prevenir los desbordamientos de muestra.</p> <p>Se han actualizado los ingredientes activos del estándar de cuantificación de ADN de la caja de accesorios para que coincida con la hoja de datos de seguridad.</p> <p>Se han actualizado las convenciones de nomenclatura del módulo VeriSeq NIPT de Local Run Manager por coherencia con otra documentación.</p> <p>Se ha añadido un historial de revisiones.</p>
N.º de documento 1000000078751 v04	Octubre de 2020	Correcciones menores.
N.º de documento 1000000078751 v03	Septiembre de 2020	Se ha actualizado la lista de materiales para incluir las especificaciones del material de laboratorio junto con las opciones compatibles conocidas.

Documento	Fecha	Descripción del cambio
N.º de documento 1000000078751 v02	Febrero de 2020	<p>Se ha actualizado la presentación de la información de Resultados clínicos para transmitir mejor las diferencias entre los cribados básicos y del genoma completo.</p> <p>Se ha añadido la sección Diferencias en el rendimiento de los cribados básicos y del genoma completo</p> <p>Se ha eliminado información contradictoria sobre la naturaleza opcional del informe adicional de la sección Principios de procedimiento.</p> <p>Se ha actualizado la convención de nomenclatura del software VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 en todo el documento para lograr una coherencia estilística.</p> <p>Se ha actualizado el etiquetado de las direcciones de Australia e Illumina Netherlands para reflejar los cambios recientes.</p>
N.º de documento 1000000078751 v01	Agosto de 2019	Se ha eliminado un paso duplicado en Extracción de ADN fetal libre circulante a causa de un error en el software de edición.
N.º de documento 1000000078751 v00	Mayo de 2019	Publicación inicial.

## Patentes y marcas comerciales

Este documento y su contenido son propiedad de Illumina, Inc. y sus afiliados ("Illumina") y están previstos solamente para el uso contractual de sus clientes en conexión con el uso de los productos descritos en él y no para ningún otro fin. Este documento y su contenido no se utilizarán ni distribuirán con ningún otro fin ni tampoco se comunicarán, divulgarán ni reproducirán en ninguna otra forma sin el consentimiento previo por escrito de Illumina. Illumina no transfiere mediante este documento ninguna licencia bajo sus derechos de patente, marca comercial, copyright ni derechos de autor o similares derechos de terceros.

Para asegurar el uso correcto y seguro de los productos descritos en este documento, el personal cualificado y adecuadamente capacitado debe seguir las instrucciones incluidas en este de manera rigurosa y expresa. Se debe leer y entender completamente todo el contenido de este documento antes de usar estos productos.

SI NO SE LEE COMPLETAMENTE EL DOCUMENTO Y NO SE SIGUEN EXPRESAMENTE TODAS LAS INSTRUCCIONES DESCRITAS EN ESTE, PODRÍAN PRODUCIRSE DAÑOS EN EL PRODUCTO, LESIONES PERSONALES, INCLUIDOS LOS USUARIOS U OTRAS PERSONAS Y DAÑOS EN OTROS BIENES Y QUEDARÁ ANULADA TODA GARANTÍA APLICABLE AL PRODUCTO.

ILLUMINA NO ASUME RESPONSABILIDAD ALGUNA DERIVADA DEL USO INCORRECTO DE LOS PRODUCTOS AQUÍ DESCRITOS (INCLUIDAS LAS PIEZAS O EL SOFTWARE).

© 2024 Illumina, Inc. Todos los derechos reservados.

Todas las marcas comerciales pertenecen a Illumina, Inc. o a sus respectivos propietarios. Si desea obtener información específica sobre las marcas comerciales, consulte [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).

## Información de contacto



Illumina, Inc.  
5200 Illumina Way  
San Diego, California 92122 (EE. UU.)  
+1 800 809 ILMN (4566)  
+1 858 202 4566 (fuera de Norteamérica)  
techsupport@illumina.com  
www.illumina.com



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

## Etiquetado de productos

Para obtener una información detallada sobre los símbolos que aparecen en las etiquetas o en el embalaje del producto, consulte la leyenda que se ofrece en [support.illumina.com](http://support.illumina.com) en la ficha *Documentation* (Documentación) del kit.

Encontrará un resumen de la seguridad y el rendimiento (SSP, Summary of Safety and Performance) en <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>, tras el lanzamiento de la base de datos europea sobre productos sanitarios (Eudamed, European Database on Medical Devices), que está vinculada al sistema Basic UDI-DI (0081627002NIPTRP).