

Folheto Informativo

PARA UTILIZAÇÃO EM DIAGNÓSTICO IN VITRO.

Utilização prevista

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

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

Resumo e explicação do ensaio

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

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

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

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

Especificamente, a International Society for Prenatal Diagnosis (Sociedade Internacional de Diagnóstico Pré-Natal), o American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG) (Colégio Americano de Obstetras e Ginecologistas)/a Society for Maternal Fetal Medicine (SMFM) (Sociedade de Medicina Materno-Fetal), o American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) (Colégio Americano de Genética e Genómica Médicas) e a European Society of Human Genetics (Sociedade Europeia de Genética Humana)/American Society of Human Genetics (Sociedade Americana de Genética Humana) apoiam a disponibilização do NIPT a todas as mulheres grávidas.^{7,8,9} Recomenda-se o aconselhamento pré-teste, o consentimento informado e os exames de diagnóstico para confirmar um resultado positivo no rastreio por cfDNA.⁴

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

Princípios do procedimento

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

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

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

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

**ATENÇÃO**

Se os tempos acima referidos forem ultrapassados, poderá afetar negativamente as taxas de falha de amostras individuais.

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

**ATENÇÃO**

Tenha extremo cuidado para evitar a contaminação cruzada dos índices, o que poderia levar a resultados incorretos.

- Os índices permitem a identificação das amostras na sequenciação subsequente.
- Os adaptadores de índice contêm sequências que permitem a captura de biblioteca na superfície sólida de uma célula de fluxo de sequenciação para geração de clusters e sequenciação subsequente.
- **Quantificação** — O produto da biblioteca é quantificado utilizando um corante fluorescente com concentração determinada por comparação com uma curva de ADN padrão.
- **Sequenciação e pooling de bibliotecas** — As bibliotecas da amostra são divididas em pools de 24 ou 48 amostras, em quantidades ajustadas para minimizar a variação da cobertura. Cada pool é depois sequenciado utilizando um sistema de sequenciação de nova geração.
- O VeriSeq NIPT Solution v2 não inclui equipamento de sequenciação e consumíveis.
- **Análise** — Para cada amostra, a análise consiste no seguinte:
 - Identificação de fragmentos de bibliotecas por sequenciação de índices e alinhamento das leituras de extremidade emparelhada com um genoma humano de referência.
 - Estimativa da fração fetal da biblioteca combinando informações da distribuição dos comprimentos e das coordenadas genómicas dos fragmentos das bibliotecas.

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

Limitações do procedimento

Limites do ensaio

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

- Doença autoimune materna
- Neoplasmas maternos (benignos e malignos)
- Mosaicismo materno
- Variações do número de cópias maternas
- Mosaicismo fetoplacentário/mosaicismo placentário confinado
- Morte fetal/gémeo desaparecido

Relatórios do VeriSeq NIPT Solution v2

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

Componentes do produto

O VeriSeq NIPT Solution v2 é composto pelas seguintes preparações de amostras:

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

O VeriSeq NIPT Solution v2 é composto pelos seguintes componentes de software:

- O VeriSeq NIPT Assay Software v2 (ref.^a 20047024), pré-instalado no VeriSeq Onsite Server v2.
 - VeriSeq Onsite Server v2 (ref.^a 20028403, 20047000, 20101927) ou um VeriSeq Onsite Server existente (ref.^a 15076164 ou 20016240) que tenha sido atualizado para a v2.
- VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 (ref.^a 20044988), pré-instalado no VeriSeq NIPT Microlab STAR.
 - VeriSeq NIPT Microlab STAR (ref.^a Hamilton Company Reno: 95475-01 (115 V) & 95475-02 (230 V), Hamilton Company Bonaduz: 806288).
- Local Run Manager VeriSeq NIPT Module (ref.^a 20044989)

Reagentes

Reagentes fornecidos

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

VeriSeq NIPT Sample Prep Kit, Extraction Box

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

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

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

Nome do reagente na etiqueta	Número de recipientes no Kit	Substâncias ativas	Armazenamento
Lysis Buffer (Tampão de lise)	1	Cloridrato de guanidina em solução aquosa tamponada	15 °C a 30 °C
Wash Buffer I (Tampão de lavagem I)	1	Cloridrato de guanidina e 2-propanol em solução aquosa tamponada	15 °C a 30 °C
Wash Buffer II (Tampão de lavagem II)	2	Solução aquosa tamponada contendo sais	15 °C a 30 °C
Elution Buffer (Tampão de eluição)	1	Solução aquosa tamponada	15 °C a 30 °C
Proteinase Buffer (Tampão de proteinase)	1	Glicerol em solução aquosa tamponada	15 °C a 30 °C
Proteinase K	4	Proteinase K liofilizada	15 °C a 30 °C

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

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

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

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

VeriSeq NIPT Sample Prep Kit, Accessory Box

Tabela 5 VeriSeq NIPT Accessory Box, ref.ª 15066811

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

VeriSeq NIPT Sample Prep Kit, Workflow Tubes and Labels

Tabela 6 Workflow Tubes and Labels, ref.ª 15071543

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

Reagentes não fornecidos

Reagentes necessários, mas não fornecidos

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

NOTA O etanol que não seja de grau de biologia molecular pode afetar negativamente o desempenho do ensaio.

Reagentes opcionais, não fornecidos

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

Armazenamento e manuseamento

1. A temperatura ambiente é definida como uma temperatura entre 15 °C e 30 °C.
2. Todos os reagentes destinam-se a uma única utilização. Após a preparação dos reagentes para utilização, deve utilizá-los imediatamente.
3. Se qualquer parte da embalagem ou do conteúdo dos componentes do VeriSeq NIPT Solution estiver danificada ou comprometida, contacte o Apoio ao Cliente da Illumina.
4. Os reagentes mantêm-se estáveis até à data de validade especificada nas etiquetas dos kits quando armazenados conforme indicado. Para obter informações sobre as condições de armazenamento, consulte a coluna Armazenamento nas tabelas da secção [Reagentes](#). Não utilize reagentes cuja data de validade expirou.
5. As alterações ao aspeto físico dos reagentes fornecidos pode indicar a deterioração dos materiais. Se ocorrerem alterações no aspeto físico (p. ex., alterações óbvias na cor ou turvação evidente do reagente podem indicar contaminação microbiana), não utilize os reagentes.
6. Adira às melhores práticas que se seguem quando manusear esferas de purificação de amostras:
 - Nunca congele as esferas.
 - Permita que as esferas atinjam a temperatura ambiente antes de utilizar.
 - Imediatamente antes de utilizar, agite as esferas em vórtice até à suspensão ideal e a cor parecer homogénea.

7. O Lysis Buffer (tampão de lise), o Wash Buffer I (tampão de lavagem I), o Wash Buffer II (tampão de lavagem II), o Elution Buffer (tampão de eluição) e o Proteinase Buffer (tampão de proteinase) podem formar precipitados ou cristais visíveis. Antes de utilizar, agite em vórtice vigorosamente e, em seguida, inspecione visualmente para garantir que não estão presentes precipitados.
8. Nunca congele o sangue total após a colheita.
9. Proceda à sequenciação das bibliotecas assim que possível após o pooling. As bibliotecas de pool mantêm-se estáveis até um máximo de 7 dias entre -25 °C e -15 °C. Não é necessária qualquer desnaturação adicional se forem armazenadas durante este período de tempo e nestas condições.

Equipamento e materiais

Equipamento e materiais necessários, mas não fornecidos

Equipamento necessário, não fornecido

Equipamento	Fornecedor
Sistema de sequenciação de nova geração (NGS) com as seguintes capacidades: <ul style="list-style-type: none"> • Sequenciação de extremidades emparelhadas 2 x 36 bp • Compatível com os adaptadores de índice duplo do VeriSeq NIPT Sample Prep Kit • Produção automática de ficheiros BCL • Química de dois canais • 400 milhões de leituras de extremidades emparelhadas por ensaio • Compatível com o VeriSeq NIPT Assay Software v2 ou um sistema de sequenciação NextSeq 550Dx. 	Fornecedor de instrumentos ou Illumina, ref. ^a 20005715
Congelador, -25 °C a -15 °C	Fornecedor geral do laboratório
Microcentrifugador	Fornecedor geral do laboratório
Pipet-Aid	Fornecedor geral do laboratório
Frigorífico, 2 °C a 8 °C	Fornecedor geral do laboratório
Pipetas de canal único de 20 µl	Fornecedor geral do laboratório
Pipetas de canal único de 200 µl	Fornecedor geral do laboratório
Pipetas de canal único de 1000 µl	Fornecedor geral do laboratório
Gerador de vórtice	Fornecedor geral do laboratório
Centrífuga e conjunto de rotor para tubos de colheita de sangue	

Equipamento	Fornecedor
<p>Equivalente:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Centrífuga refrigerada com capacidade de 1600 × g com opção “sem travão” • Rotor de reservatório oscilante com reservatórios • Inserções de reservatório com profundidade mínima de 76 mm • Adaptadores de inserção para suportar tubos de colheita de sangue de 16 mm x 100 mm 	Fornecedor geral do laboratório
<p>Recomendado:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Allegra X12R Series Centrifuge, 1600 g • Allegra Centrifuge GH-3.8, Rotor com reservatórios • Allegra Centrifuge Bucket Covers, conjunto de dois • Allegra Centrifuge Adapter Assembly, 16 mm, conjunto de quatro 	<p>Beckman Coulter, artigo N.º 392304 (120 V ou 230 V)</p> <p>Beckman Coulter, artigo N.º 369704</p> <p>Beckman Coulter, artigo N.º 392805</p> <p>Beckman Coulter, artigo N.º 359150</p>
Conjunto de centrífuga e rotor para microplacas	
<p>Equivalente:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Centrífuga com capacidade de 5600 × g • Rotor de placa oscilante com suportes de placas de 96 poços, profundidade mínima de 76,5 mm. • Multifuge X4 Pro-MD 120 V TX-1000BT • Sorvall Legend XTR Centrifuge 	Fornecedor geral do laboratório
<ul style="list-style-type: none"> • HIGHPlate 6000 Microplate Rotor • Rotor high plate 6000 <p>Base de suporte para microplacas</p> <ul style="list-style-type: none"> • Recomendado: <ul style="list-style-type: none"> • Base de suporte MicroAmp de 96 poços • Suporte de placas PCR de 96 poços 	<p>Thermo Fisher Scientific ref.ª 75016034</p> <p>Thermo Fisher Scientific, ref.ª 75004521 (120 V) ou ref.ª 75004520 (230 V)</p> <p>Thermo Fisher Scientific, ref.ª 75003606</p> <p>Thermo Scientific VWR, ref.ª 97040-244</p> <p>Thermo Fisher Scientific, ref.ª 4379590</p> <p>Thermo Fisher Scientific, ref.ª AB-0563/1000</p>
Um dos seguintes leitores de microplacas ou equivalente (fluorómetro) com o SoftMax Pro v6.2.2–7.1.2:	
<ul style="list-style-type: none"> • Gemini XPS • SpectraMax M2, M3, M4 e M5. <ul style="list-style-type: none"> • Inserção roxa obrigatória com o leitor de microplacas para utilização no fluxo de trabalho. 	<p>Molecular Devices, ref.ª XPS</p> <p>Dispositivos moleculares, ref.ª M2, M3, M4 e M5</p>
SpectraMax High-Speed USB, adaptador de série	Molecular Devices, ref.ª 9000-0938

Equipamento	Fornecedor
Termociclador com as seguintes especificações: <ul style="list-style-type: none"> • Tampa aquecida • Intervalo de temperatura entre 4 °C e 98 °C • ±2 °C de precisão de temperatura • 2 °C por segundo de taxa de aumento mínima • Compatível com placa Twin.tec PCR de 96 poços, saia completa 	Fornecedor geral do laboratório
VeriSeq NIPT Microlab STAR	Hamilton, ref. ^a 95475-01 (115 V), ref. ^a 95475-02 (230 V) ou ref. ^a 806288 (para Hamilton Company Bonaduz)
VeriSeq Onsite Server v2 ou um VeriSeq Onsite Server atualizado	Illumina, ref. ^a 20028403 ou 20047000 (v2) ou 20101927 ou ref. ^a 15076164 ou ref. ^a 20016240 (atualizado)
Se utilizar um sistema de sequenciação NextSeq 550Dx: <ul style="list-style-type: none"> • NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5, 75 ciclos 	Illumina, ref. ^a 20028870

Equipamento opcional, não fornecido

Equipamento	Fornecedor
Sistema de descapsulação Pluggo	LGP Consulting, ref. ^a 4600 4450
Placa de validação por fluorescência SpectraMax SpectraTest FL1	Molecular Devices, ref. ^a 0200-5060
Rotador/revólver de tubos, tubos de 15 ml, 40 rpm, 100–240 V	Thermo Scientific, ref. ^a 88881001 (EUA) ou ref. ^a 88881002 (UE)

Materiais necessários, não fornecidos

Consumível	Fornecedor
Pontas de filtro condutoras não esterilizadas de 1000 µl	Hamilton, ref. ^a 235905
Pontas de filtro condutoras não esterilizadas de 300 µl	Hamilton, ref. ^a 235903
Pontas de filtro condutoras não esterilizadas de 50 µl	Hamilton, ref. ^a 235948

Consumível	Fornecedor
<p>Reservatório de poços profundos com as seguintes especificações:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Formato de microplaca SLAS 1-2004 com 96 poços com fundo em pirâmide ou cónico e uma capacidade mínima de 240 ml. • Polipropileno com preferência para baixa ligação de ADN para todas as superfícies de contacto com a amostra. • As dimensões internas (nível de líquido) são compatíveis com os passos automatizados de aspiração e dispensação do VeriSeq NIPT Microlab STAR. • As dimensões referentes à altura são compatíveis com os movimentos automatizados do VeriSeq NIPT Microlab STAR. 	<p>Fornecedor geral do laboratório</p> <p>Reservatórios compatíveis:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Corning Axygen, ref.^a RES-SW96-HP-SI • Agilent, ref.^a 201246-100
<p>Tina de reagente com as seguintes especificações:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Tina que se encaixa em segurança, sem forçar, no suporte do VeriSeq NIPT Microlab STAR, com um fundo cónico e uma capacidade mínima de 20 ml. • Polipropileno isento de RNase/DNase. • As dimensões internas do reservatório (nível de líquido) geram níveis de líquido utilizando volumes de reagente do ensaio compatíveis com os passos automatizados de aspiração e dispensação do VeriSeq NIPT Microlab STAR. • As dimensões referentes à altura são compatíveis com os movimentos automatizados do VeriSeq NIPT Microlab STAR. 	<p>Tinas compatíveis:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Illumina Reagent Tub, ref.^a 20095418

Consumível	Fornecedor
<p>Placas de poços profundos com as seguintes especificações:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Formato de microplaca SLAS 1–2004, 3–2004 e 4–2004 com 96 poços com fundo em pirâmide ou cónico e uma capacidade mínima do poço de 2 ml. • Polipropileno translúcido, com preferência para material com baixa ligação de ADN para todas as superfícies de contacto com a amostra. • As dimensões do poço geram um nível de líquido compatível com os passos automatizados de aspiração e dispensação do VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Saia de placas que permita a colocação de códigos de barra da placa na posição necessária com adesão segura a uma superfície plana. • Estrutura resistente a torção para aguentar no mínimo 5600 × g. • As dimensões referentes à altura da placa são compatíveis com os movimentos automatizados do VeriSeq NIPT Microlab STAR 	<p>Fornecedor geral do laboratório</p> <p>Placas compatíveis:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Eppendorf, ref.^a 0030505301 • Eppendorf, ref.^a 30502302 • USA Scientific, ref.^a 1896-2000
<p>Placas de 384 poços com as seguintes especificações:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Microplaca com 384 poços, otimizada para volumes reduzidos, com uma capacidade mínima do poço de 50 µl. • Poliestireno preto opaco com bloqueio de luz e baixa ligação de ADN para todas as superfícies de contacto com a amostra. • As dimensões do poço geram um nível de líquido compatível com os passos automatizados de aspiração e dispensação do VeriSeq NIPT Microlab STAR. • As dimensões referentes à altura da placa são compatíveis com os movimentos automatizados do VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Saia de placas que permita a colocação de códigos de barra da placa na posição necessária com adesão segura a uma superfície plana. 	<p>Fornecedor geral do laboratório</p> <p>Placas compatíveis:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Corning, ref.^a 3820

Consumível	Fornecedor
<p>Placas de 96 poços com as seguintes especificações:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Microplaca com uma estrutura resistente a torção com capacidade para aguentar no mínimo 5600 × g e 96 poços translúcidos com fundos cônicos, bordas elevadas e uma capacidade mínima do poço de 150 µl. • Polipropileno isento de RNase/DNase com baixa ligação de ADN para todas as superfícies de contacto com a amostra. • As dimensões do poço geram um nível de líquido compatível com os passos automatizados de aspiração e dispensação do VeriSeq NIPT Microlab STAR. • As dimensões referentes à altura da placa são compatíveis com os movimentos automatizados do VeriSeq NIPT Microlab STAR. <p>NOTA: Peças de plástico compatíveis com diferentes referências, por exemplo, placas de 96 poços compatíveis de diferentes fabricantes, podem não ser diretamente intercambiáveis sem uma calibração específica de cada peça do sistema VeriSeq NIPT Microlab STAR pelos funcionários de assistência e apoio da Illumina. Para mudar as peças de plástico, consulte a equipa de apoio da Illumina.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Saia de placas que permita a colocação de códigos de barra da placa na posição necessária com adesão segura a uma superfície plana. • Compatível com termocicladores para desnaturação. 	<p>Fornecedor geral do laboratório</p> <p>Placas compatíveis:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Eppendorf, ref.^a 0030129512 • Eppendorf, ref.^a 30129580 • Eppendorf, ref.^a 30129598 • Eppendorf, ref.^a 30129660 • Eppendorf, ref.^a 30129679 • Bio-Rad, ref.^a HSP9601
<p>Um dos seguintes selos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Selo de alumínio Microseal 'F' • Selos de alumínio 	<p>Bio-Rad, ref.^a MSF1001</p> <p>Beckman Coulter, ref.^a 538619</p>
Cell-Free DNA BCT CE	Streck, ref. ^a 218997
Tampas de pressão	Sarstedt, ref. ^a 65.802
Tubos de tampa de rosca de 2 ml	Fornecedor geral do laboratório
Pontas de filtro de 20 µl para pipetador de 20 µl	Fornecedor geral do laboratório
Pontas de filtro de 200 µl para pipetador de 200 µl	Fornecedor geral do laboratório
Pontas de filtro de 1000 µl para pipetador de 1000 µl	Fornecedor geral do laboratório

Consumível	Fornecedor
Equivalente: <ul style="list-style-type: none"> • Um desinfetante rápido em spray à base de álcool • Uma solução com detergente desinfetante Recomendado: <ul style="list-style-type: none"> • Água desionizada e etanol a 70% 	Fornecedor geral do laboratório

Materiais opcionais, não fornecidos

Consumível	Fornecedor
Soro fisiológico fosfato-tamponado da Dulbecco (DPBS) para controlo sem modelo (NTC)	Fornecedor geral do laboratório
Tubo com tampa de rosca, 10 ml (apenas para amostras de controlo)	Sarstedt, ref.ª 60.551
Tubo com tampa de rosca, 50 ml	Fornecedor geral do laboratório
Pipetas serológicas de 25 ml	Fornecedor geral do laboratório
Pipetas serológicas de 10 ml	Fornecedor geral do laboratório

Colheita, transporte e armazenamento de espécimes



ATENÇÃO

Manuseie todos os espécimes como se fossem agentes potencialmente infecciosos.

- As amostras de sangue total de 7–10 ml têm de ser colhidas num Cell-Free DNA BCT da Streck. Não congele.
- O transporte de sangue total tem de cumprir todas as normas regulamentadoras aplicáveis para o transporte de agentes etiológicos. São recomendados métodos de expedição/transporte rápido.
- Durante o transporte, armazene a temperaturas entre os 4 °C e os 30 °C. Depois de receber as amostras, armazene entre os 2 °C e os 8 °C até que tudo esteja pronto para avançar. O tempo entre a colheita de sangue e o isolamento inicial do plasma não deve ultrapassar os 5 dias.
- Na eventualidade de ser necessário testar novamente, as amostras pós-processamento podem ser novamente tapadas e armazenadas a 4 °C durante mais 5 dias (até um total de 10 dias após a colheita de sangue).



ATENÇÃO

A exposição a temperaturas elevadas acima dos intervalos acima mencionados pode ter um impacto negativo nas taxas de falha das amostras individuais e/ou desempenho das amostras.

Avisos e precauções

- Este ensaio contém Proteinase K. Podem ocorrer lesões pessoais por inalação, ingestão, contacto com a pele e contacto ocular. Utilize numa área bem ventilada, use roupa de proteção, evite respirar o pó e elimine quaisquer recipientes e conteúdos não utilizados de acordo com as normas de segurança governamentais aplicáveis.
- Este ensaio contém cloreto de guanidínio. Podem ocorrer lesões pessoais por inalação, ingestão, contacto com a pele e contacto ocular. Utilize numa área bem ventilada, use roupa de proteção e elimine quaisquer recipientes e conteúdos não utilizados de acordo com as normas de segurança governamentais e locais aplicáveis.
- Este ensaio contém 2-propanol, um químico inflamável. Mantenha afastado do calor e chama desprotegida. Podem ocorrer lesões pessoais por inalação, ingestão, contacto com a pele e contacto ocular. Utilize numa área bem ventilada, use roupa de proteção e elimine quaisquer recipientes e conteúdos não utilizados de acordo com as normas de segurança governamentais e locais aplicáveis.
- Este ensaio contém dimetil sulfóxido, um líquido corrosivo e combustível. Podem ocorrer lesões pessoais por inalação, ingestão, contacto com a pele e contacto ocular. Utilize numa área bem ventilada, use roupa de proteção e elimine quaisquer recipientes e conteúdos não utilizados de acordo com as normas de segurança governamentais e locais aplicáveis.
- Para impedir a formação de gases perigosos, não elimine resíduos de extração de cfDNA (contém cloridrato de guanidina) juntamente com resíduos que contenham lixívia (hipoclorito de sódio).
- Manuseie todas as amostras como se contivessem agentes potencialmente infecciosos.
- Aplique as precauções de rotina do laboratório. Não faça a pipetagem com a boca. Não coma, beba ou fume nas áreas designadas para trabalho. Use luvas descartáveis e batas de laboratório quando manusear amostras e reagentes de ensaio. Lave bem as mãos depois de manusear amostras e reagentes de ensaio.
- Não utilize componentes de ensaio após a data de validade indicada na etiqueta da respetiva caixa. Não troque componentes de ensaio de lotes diferentes. Os lotes de ensaio estão identificados na etiqueta da respetiva caixa. Armazene os componentes de ensaio à temperatura especificada.
- Para evitar a degradação da amostra ou do reagente, certifique-se de que todos os vapores de hipoclorito de sódio decorrentes da limpeza estão totalmente dissipados antes de iniciar o protocolo.
- O não cumprimento dos procedimentos da forma descrita pode resultar em resultados erróneos ou na redução significativa da qualidade das amostras.
- Comunique imediatamente quaisquer incidentes graves relacionados com este produto à Illumina e às autoridades competentes dos Estados-Membros nos quais o utilizador e o paciente estão estabelecidos.

- Para obter informações ambientais, de saúde e de segurança, consulte as fichas de dados de segurança (FDS) em support.illumina.com/sds.html.

Notas processuais

Evitar a contaminação

- Utilize pontas e consumíveis de laboratório novos.
- Utilize pontas resistentes a aerossóis para reduzir o risco de contaminação por arrastamento e contaminação cruzada entre amostras.
- Devido ao potencial de contaminação, tenha o máximo de cuidado para garantir que o conteúdo dos poços permanece no poço. Não permita salpicos do conteúdo. Centrifugue após qualquer passo de agitação por vórtice.
- Siga as normas regulamentadoras aplicáveis sobre práticas de laboratório e higiene adequadas quando manusear sangue e derivados do sangue.
- Não utilize sprays aerossóis com lixívia quando estiver a preparar uma biblioteca. A contaminação com vestígios de lixívia pode conduzir à falha do ensaio.
- Ao retirar selos de placas, tenha cuidado para colocar a placa numa superfície plana e firme, segurando firmemente a placa. Retire lentamente o selo, assegurando que este não contacta com poços expostos. Tenha cuidado para não tocar em poços expostos nem perturbar o conteúdo. A contaminação cruzada entre poços pode produzir resultados incorretos.

Limpeza da plataforma do VeriSeq NIPT Microlab STAR

- Antes de utilizar, verifique se a plataforma se encontra limpa. Pelo menos uma vez por semana, realize uma manutenção semanal e siga estas instruções de limpeza.
- Remova todos os suportes descarregáveis e limpe com um desinfetante rápido em spray à base de álcool com água desionizada e etanol a 70% e deixe secar. Se estiverem demasiado sujos, mergulhe-os depois numa solução com detergente desinfetante, enxague com desinfetante à base de álcool e deixe secar.
- Abra a cobertura frontal e limpe a plataforma com um pano saturado com água desionizada e etanol a 70%. Em particular, tem de verificar se os blocos deslizantes estão limpos.
- Remova o tubo do sistema de vácuo básico (BVS) e limpe o tubo, as juntas e os compartimentos internos do BVS com um pano. Evite limpar as juntas com etanol, pois pode ser abrasivo para o material.
- Esvazie o recipiente de resíduos de pontas da cabeça CORE de 96 pipetas e do canal independente.

- Remova a placa de ejeção de pontas do canal independente da estação de resíduos de pontas e limpe-a: coloque o spray de água desionizada e etanol a 70% diretamente na superfície e limpe. Coloque um novo saco de plástico sobre a estrutura e volte a fixá-la. Volte a colocar a placa de ejeção de pontas limpa no lugar.
- Coloque o spray de água desionizada e etanol a 70% diretamente na superfície e na calha da caixa de resíduos da cabeça CORE de 96 pipetas e limpe bem.
 - Se for difícil remover a sujidade dos resíduos de pontas, limpe com um pano molhado com água sem DNase/RNase até remover a sujidade. Elimine o pano devidamente. Esterilize com desinfetante à base de álcool.
- Humedeça um pano sem pelos ou uma compressa de algodão com etanol a 70%. Passe a compressa pela janela do scanner a laser do leitor de códigos de barras. Utilize o mesmo pano ou compressa para limpar cada poço do adaptador de placas do CPAC. Se utilizar um pano, pressione o pano em cada poço do adaptador com a parte de trás de uma caneta para assegurar que o interior do poço fica bem limpo.
- Limpe os canais independentes:
 - Nos canais independentes, limpe a manga de ejeção da ponta (parte exterior dos canais de pipetagem) com um pano sem pelos embebido em água desionizada e etanol a 70%. (Consulte o *Guia de Referência do Hamilton Microlab STAR N.º 15070074.*)
 - Limpe o disco de paragem e os O-rings da cabeça de pipetagem (peça exterior dos canais de pipetagem) com um pano sem pelos embebido em água desionizada e etanol a 70%.
- Limpe a cabeça CORE de 96 pipetas:
 - Com o mesmo pano sem pelos embebido em água desionizada e etanol a 70%, limpe a caixa da cabeça CORE de 96 pipetas e a parte de baixo dos discos de paragem.
 - Utilizando o mesmo pano ou uma tira de pano embebida em água desionizada e etanol a 70%, passe-o entre as partes laterais dos canais de pipetagem da cabeça CORE de 96 pipetas para limpar os O-rings. Repita este procedimento para cada canal de pipetagem na cabeça CORE de 96 pipetas.
- Coloque o spray de água desionizada e etanol a 70% nas coberturas frontal e lateral e limpe até secar.
- Limpe a fita de proteção da unidade de carregamento automático com um pano embebido em água desionizada e etanol a 70% e limpe sem exercer pressão.
- Quando a plataforma e os componentes estiverem completamente secos, reponha os suportes.

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

Controlo de qualidade

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

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

Não ultrapasse duas amostras de NTC (controlo sem modelo) por lote de 24 ou 48 amostras ou quatro amostras de NTC por lote de 96 amostras.

Instruções de utilização

Sugestões e técnicas

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

Colocar códigos de barras nas placas

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

Colocar e retirar selos da placa

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

VeriSeq NIPT Microlab STAR

- Antes de utilizar, efetue e documente a manutenção necessária de acordo com as instruções do fabricante.
- Observe o ML STAR durante os passos automáticos. Monitorize a interface do software VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 para verificar solicitações e instruções para o operador.
- Mantenha a cobertura frontal colocada durante o funcionamento.

- Mantenha a plataforma desimpedida durante o funcionamento.
- Se visualizar o botão de opção **Exclude** (Excluir) durante um evento de erro ao manusear, não escolha esta opção em circunstância alguma. Se o método não conseguir ultrapassar o evento de erro ao manusear ou tiver opções de resolução de erros limitadas, interrompa o ensaio.
- Durante os passos de vácuo de placas, se solicitado pelo VeriSeq NIPT Workflow Manager v2, ajude manualmente a formar o selo entre a placa e o tubo de vácuo.
- Permita ao sistema eliminar as pontas do adaptador automaticamente. Não remova manualmente as pontas, a menos que seja solicitado pelo software.
- Remova os reagentes gastos e os consumíveis utilizados conforme solicitado pelo Workflow Manager (Gestor de fluxo de trabalho).
- Esvazie o garrafão de resíduos de vácuo diariamente. O primeiro garrafão nunca deve exceder ½ da capacidade. O transbordo de resíduos de vácuo pode danificar a bomba de vácuo e pode reduzir o vácuo aplicado do sistema.
- Para lotes de 24, 48 e 96 amostras, carregue uma rack completa das pontas de 8 canais contadas individualmente antes de iniciar o método.

Processar amostras

Procedimento

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



ATENÇÃO

As amostras que tenham sido armazenadas ou manuseadas incorretamente podem deixar de ser adequadas. Se amostras inadequadas forem processadas ao longo do fluxo de trabalho, podem obstruir a placa de ligação durante as extrações, provocando o transbordo de amostras para os poços adjacentes.

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



ATENÇÃO

Durante um evento de erro ao manusear, se lhe for apresentada a opção Excluir (Excluir), não a seleccione. Se o método não conseguir ultrapassar o evento de erro ao manusear e tiver opções de resolução de erros limitadas, interrompa o ensaio.

Isolar plasma

Preparação

1. Coloque 1 etiqueta com a indicação "Plasma intermédio" numa placa de poços profundos e aplique um código de barras.
2. Coloque 1 etiqueta com a indicação "Plasma final" numa placa de poços profundos e aplique um código de barras.
3. Para lotes de 24, 48 e 96 amostras, carregue uma rack completa das pontas de 8 canais contadas individualmente antes de iniciar o método.



ATENÇÃO

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

Procedimento

1. Abra o AppLauncher e, em seguida, seleccione **VeriSeq NIPT Method** (Método VeriSeq NIPT).
2. Introduza um ID do lote e nome de utilizador únicos e, em seguida, seleccione **OK**.
O ID do lote pode conter ≤ 26 caracteres. Pode utilizar números, letras, sublinhados (_) ou hífenes (-).
Por exemplo: 2025-10-16_Batch3.
O ID do lote não é sensível a maiúsculas e minúsculas. Os ID de lotes sensíveis a maiúsculas e minúsculas não são considerados únicos.
Os nomes dos lotes devem ser únicos e não diferir apenas em termos de maiúsculas e minúsculas.
Por exemplo, os nomes de lotes Batch01 e batch01 não são únicos. A mesma regra aplica-se aos nomes de ID de amostras.

3. Selecione **New Batch** (Novo lote).
4. Após a iniciação, selecione **OK** para iniciar o isolamento do plasma.
5. Selecione o tamanho do lote e, em seguida, selecione **OK**.
6. Selecione o número de controlos sem modelo (NTC) e, em seguida, selecione **OK**.
As posições de NTC são sempre as últimas posições selecionadas. Por exemplo, no caso de dois NTC num ensaio de 24 amostras, as posições 23 e 24 são NTC.
7. Execute um dos seguintes passos:
 - Para carregar uma ficha de amostras existente, selecione a ficha de amostras associada ao lote e, em seguida, selecione **OK**.
 - Para avançar sem selecionar uma ficha de amostras, selecione **No Sample Sheet** (Sem ficha de amostras).

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

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

8. Confirme que todos os códigos de barra estão afixados e, em seguida, coloque as amostras, as pontas e as placas (com o código de barras voltado para a direita) no suporte.
9. Selecione **OK** depois de cada pedido de confirmação de carregamento.

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

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

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

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

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

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

PONTO DE PARAGEM DE SEGURANÇA

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

Extração de cfDNA

Preparação

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

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

3. Adicione lentamente 3,75 ml de tampão de proteinase a cada frasco de reagente de Proteinase K.
 - Prepare 3 frascos para 24 e 48 amostras.
 - Prepare 4 frascos para 96 amostras.

4. Tape os frascos de Proteinase K e agite em vórtice até à ressuspensão.



ATENÇÃO

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

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

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

Procedimento

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



ATENÇÃO

Antes de iniciar o método para os lotes de 24, 48 e 96 amostras, adicione uma rack completa de pontas de 8 canais.

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

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

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

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

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

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

13. Confirme que a placa de ligação de ADN tem código de barras e, em seguida, seleccione **OK**.
14. Em lotes de placas parciais, coloque um selo de placa recortado nos poços não utilizados (colunas 4–12 para lotes de 24 amostras e colunas 7–12 para lotes de 48 amostras).
15. Coloque a placa de ligação de ADN no tubo de vácuo com o código de barras voltado para o lado direito.
16. Antes de colocar a placa de ligação no tubo do BVS, inspecione visualmente os poços para detetar possíveis obstruções.
Estas podem impedir o fluxo de reagentes sob vácuo.
17. Se utilizar lotes de 24 ou 48 amostras, cubra os poços não utilizados e sele-os com selo de alumínio. Seleccione a caixa de verificação **Are DNA Binding Plate Columns Sealed?** (As colunas da placa de ligação de ADN encontram-se seladas?) e, em seguida, seleccione **OK**.
18. Coloque as tinas de reagente no suporte de reagentes da forma que se segue e, em seguida, seleccione **OK**.

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

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

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

21. Aguarde pela conclusão da verificação automática do volume de reagente.
22. Confirme que o recipiente de resíduos de vácuo se encontra vazio (recomenda-se que esteja a metade da sua capacidade) e, em seguida, selecione **OK**.
23. Confirme a colocação de todos os suportes, material do laboratório e reagentes e, em seguida, selecione **OK** no ecrã Extraction Deck Verification (Verificação da plataforma de extração).
24. Observe o ML STAR durante os passos automáticos.



ATENÇÃO

Tem de invalidar manualmente os transbordos de amostra não detetados pelo sistema antes da contaminação dos poços circundantes.

25. Após o passo de vácuo final, remova a placa de ligação de ADN e limpe a superfície inferior com EtOH a 70%.
26. Coloque o selo em quaisquer poços destapados na placa de ligação de ADN e coloque a placa de ligação de ADN na placa vazia de poços profundos de plasma final.
27. Centrifugue o conjunto da placa de ligação de ADN/placa de plasma final a 5600 × g durante 10 minutos com o travão ativado.
28. Selecione **OK**.
29. Durante a centrifugação da placa de ligação de ADN, proceda à limpeza a vácuo:
- Remova o tubo de vácuo e, em seguida, selecione **OK**.

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

PONTO DE PARAGEM DE SEGURANÇA

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

Preparar bibliotecas

Preparação

1. Examine visualmente as caixas de preparação de bibliotecas e acessórios para confirmar que a data de validade dos kits não expirou.
2. Prepare os seguintes reagentes. Coloque uma etiqueta nas tinas de reservatório e nos reservatórios de poços profundos com os nomes dos reagentes.

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

**ATENÇÃO**

Ao retirar o selo da placa adaptadora de ADN NIPT, tenha extremo cuidado para evitar contaminação cruzada por aerossóis de poço para poço, o que pode produzir resultados incorretos.

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

Diluir enzimas

1. Combine a mistura de poliadenilação (A-Tailing Mix) e o tampão de ressuspensão (Resuspension Buffer) num tubo com tampa de rosca. Agite por vórtice para misturar e, em seguida, centrifugue brevemente.

Tamanho do lote de amostras	A-Tailing Mix (µl)	Resuspension Buffer (µl)
24, 48	900	1200
96	1800	2400

2. Combine a mistura de ligação (Ligation Mix) e o tampão de ressuspensão (Resuspension Buffer) num tubo com tampa de rosca. Agite por vórtice para misturar e, em seguida, centrifugue brevemente.

Tamanho do lote de amostras	Ligation Mix (µl)	Resuspension Buffer (µl)
24, 48	230	1713
96	440	3278

Procedimento

1. Selecione **OK** para iniciar a preparação de bibliotecas. Se o **VeriSeq NIPT Method** (Método VeriSeq NIPT) ainda não estiver aberto:
 - a. Abra o AppLauncher e selecione **VeriSeq NIPT Method** (Método VeriSeq NIPT).
 - b. Introduza o ID do lote e o nome de utilizador e, em seguida, selecione **OK**.
2. Confirme que os seguintes consumíveis foram preparados, conforme indicado no ecrã Reagent Preparation (Preparação de reagentes):
 - A-Tailing Mix (Mistura de poliadenilação), Ligation Mix (Mistura de ligação) e EtOH a 80%

- Sample Purification Beads (Esferas de purificação de amostras), End Repair Mix (Mistura de reparação de extremidades) e NIPT DNA Adapter Plate (Placa adaptadora de ADN NIPT)
3. Selecione as caixas de verificação e, em seguida, selecione **OK**.
 4. Proceda à leitura dos códigos de barras das caixas de preparação da biblioteca.
 5. Introduza o nome de utilizador ou as iniciais do preparador do reagente e, em seguida, selecione **OK**.
 6. Leia os códigos de barras da caixa de acessórios.
 7. Introduza o nome de utilizador ou as iniciais do preparador do reagente e, em seguida, selecione **OK**.
 8. Coloque as pontas nos suportes das pontas da forma que se segue e, em seguida, selecione **OK** para cada suporte.

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

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

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

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

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

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

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

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

13. Coloque as tinas de reagente no suporte de reagentes da forma que se segue e, em seguida, seleccione **OK**.

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

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

15. Certifique-se de que os suportes, o material do laboratório e os reagentes são carregados conforme indicado e, em seguida, selecione **OK** no ecrã Library Deck Verification (Verificação da plataforma de bibliotecas).
16. Aguarde pela conclusão da verificação automática do volume de reagente.
17. Observe o ML STAR durante os passos automáticos.
18. Quando solicitado pelo Workflow Manager (Gestor de fluxo de trabalho), certifique-se de que a plataforma de carregamento do ML STAR está livre de obstruções para permitir que o ML STAR descarregue os suportes.
19. Selecione **Unload** (Descarregar) para descarregar a plataforma.
20. Inspeccione a placa de bibliotecas para verificar se os volumes são consistentes em cada poço.



ATENÇÃO

Se os volumes dos poços estiverem inconsistentes, as amostras podem falhar o controlo de qualidade automatizado.

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

PONTO DE PARAGEM DE SEGURANÇA

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

Quantificar bibliotecas

Preparação

1. Prepare os seguintes reagentes:

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

Reagente	Armazenamento	Instruções
DNA Quantification Standard (Padrão de quantificação de ADN)	2 °C a 8 °C	Agite por vórtice para misturar e, em seguida, centrifugue brevemente.
Resuspension Buffer (Tampão de ressuspensão)	2 °C a 8 °C	Agite por vórtice para misturar.

2. Se a placa de bibliotecas tiver sido armazenada congelada, prepare-a da seguinte forma.
 - a. Confirme que a placa não está armazenada há mais de 7 dias e descongele à temperatura ambiente.
 - b. Agite por vórtice para misturar.
 - c. Centrifugue a 1000 × g durante 1 minuto.
3. Ligue o fluorómetro 10 minutos antes de utilizar.
4. Aplique um código de barras numa nova placa de 384 poços.
5. Aplique um código de barras numa nova placa de saia completa.

Procedimento

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

Tamanho do lote de amostras	Tipo de suporte	Pista	Item	Posição do local
24, 48	Ponta	1–6	Rack de pontas de 300 µl	1
			Rack de pontas de 50 µl	2
96	Ponta	1–6	Rack de pontas de 300 µl	1
			Rack de pontas de 50 µl	2, 3

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

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

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

Tamanho do lote de amostras	Tipo de suporte	Pista	Item	Posição do local
24, 48, 96	Tubo	46	DNA Quantification Standard	1
			DNA Quantification Reagent	2

10. Coloque as tinas de reagente no suporte de reagentes da forma que se segue e, em seguida, seleccione **OK**.

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

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

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

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



ATENÇÃO

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

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

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

Análise

1. No ML STAR, no ecrã Scanner Information (Informações do scanner), introduza o ID do fluorómetro.
2. Introduza comentários sobre a execução do fluorómetro e, em seguida, selecione **OK**.
3. Aceda ao ficheiro de quantificação *.xml que contém os dados fluorométricos e, em seguida, selecione **OK**.
4. Reveja os resultados da análise da curva padrão e da concentração da amostra e, em seguida, selecione **OK**.
5. Se for necessário repetir a leitura da placa, selecione **Rescan** (Repetir leitura).
As amostras são sensíveis à luz e ao tempo. Quando necessário, repita a leitura imediatamente.
6. Introduza comentários sobre os poços afetados e, em seguida, selecione **OK**.
7. Avalie os resultados e continue da forma que se segue.
 - Se os resultados forem aprovados na especificação, avance para [Criar pool de bibliotecas na página 42](#). Para as especificações, consulte a tabela de métricas e limites de CQ de quantificação no *Guia do Software VeriSeq NIPT Solution v2 (documento n.º 1000000067940)*.
 - Se os resultados falharem a especificação, o sistema interrompe o método. Repita os procedimentos de quantificação, começando pela [Preparação na página 37](#).
8. Execute um dos seguintes passos:
 - Para avançar para [Criar pool de bibliotecas na página 42](#), selecione **Yes** (Sim).
 - Para parar, selecione **Exit** (Sair).

PONTO DE PARAGEM DE SEGURANÇA

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

Criar pool de bibliotecas

Preparação

1. Prepare os seguintes reagentes:

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

2. Se a placa de bibliotecas tiver sido armazenada congelada, prepare-a da seguinte forma.
 - a. Confirme que a placa não está armazenada há mais de 7 dias e descongele à temperatura ambiente.
 - b. Agite por vórtice a 1500 rpm durante 1 minuto.
 - c. Centrifugue a 1000 × g durante 20 segundos.
 - d. Pipete para misturar.
3. Coloque uma etiqueta de Pool A num tubo de pooling vazio. Para 96 amostras, coloque uma etiqueta de Pool B num segundo tubo de pooling vazio.
4. Guarde o seguinte programa de desnaturação no termociclador com uma tampa aquecida.
 - a. Escolha a opção de tampa pré-aquecida e defina como 102 °C.
 - b. Defina o volume de reação como 50 µl.
 - c. Defina a taxa de aumento para o máximo (≥ 2 °C por segundo).
 - d. Incube a 96 °C durante 10 minutos e, em seguida, a 4 °C durante 5 segundos.
 - e. Mantenha nos 4 °C.

Procedimento

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

NOTA As concentrações de pooling e/ou volumes de pooling podem ter de ser aumentados para lotes de 24 amostras de forma a manter densidades de cluster semelhantes às obtidas com os lotes de 48/96 amostras.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

13. Introduza a localização das primeira e última pontas de cada rack de pontas e, em seguida, selecione **OK**.
14. Certifique-se de que os suportes, o material do laboratório e os reagentes estão colocados conforme indicado.
15. No ecrã Pooling Deck Verification (Verificação da plataforma de pooling), selecione **OK**.
16. Observe o ML STAR durante os passos automáticos.
17. Introduza comentários sobre os poços afetados e, em seguida, selecione **OK**.
18. Quando solicitado pelo Workflow Manager (Gestor de fluxo de trabalho), certifique-se de que a plataforma de carregamento do ML STAR está livre de obstruções para permitir que o ML STAR descarregue os suportes.
19. Selecione **Unload** (Descarregar) para descarregar a plataforma.
20. Retire o suporte de tubos.
21. Tape cada tubo de pooling, agite em vórtice e centrifugue brevemente.
22. Selecione **OK**.
23. Proceda à sequenciação das bibliotecas assim que possível após o pooling. Sele a placa de bibliotecas e armazene entre os -25 °C e os -15 °C durante até 7 dias, para poder voltar a fazer o pool.

PONTO DE PARAGEM DE SEGURANÇA

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

Preparar bibliotecas de pool para sequenciação

Preparação

1. Prepare os seguintes reagentes:

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

2. Prepare o sistema de sequenciação de nova geração preenchendo os seguintes campos do módulo Local Run Manager VeriSeq NIPT Module:
 - a. Run Name (Nome do ensaio)
 - b. **[Opcional]** Run Description (Descrição do ensaio)
 - c. Pool Barcode (Código de barras do pool)



ATENÇÃO

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

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

Procedimento

1. Combine os volumes que se seguem no cartucho de reagentes e proceda à pipetagem para misturar.
 - Hybridization Buffer (Tampão de hibridização) (900 µl)
 - Pool A de 450 µl (450 µl)
2. Prossiga com a sequenciação utilizando o guia de referência do seu instrumento de sequenciação de nova geração. Para um NextSeq 550Dx, consulte o *Guia de Referência do NextSeq 550Dx Instrument (documento n.º 1000000009513)* (ou consulte o folheto informativo aplicável conforme listado na página de assistência da Illumina www.support.illumina.com).
3. Confirme a configuração correta do ensaio quando for solicitado.
4. Se necessário, repita este procedimento para o Pool B.
 - Para alcançar um intervalo de densidade-alvo do cluster, pode ser feito um novo pool da placa de bibliotecas utilizando uma concentração de pool diferente no Hamilton. Ao realizar novamente o pool, invalida o pool original.
 - Em alternativa, a razão do pool para HT1 (450 µl + 900 µl) pode ser modificada para alcançar um intervalo de densidade-alvo do cluster.

Sequenciação de nova geração

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

- Capacidade de 2x36 leituras com extremidades emparelhadas
- Compatível com adaptadores de índice no VeriSeq NIPT Sample Prep Kit
- Química de dois canais

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

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

Análise de dados de sequenciação

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

Interpretação dos resultados

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

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

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

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

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

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

NOTA Quando todas as amostras de um lote têm o mesmo sexo reportado, um alerta de erro por e-mail/WebUI irá alertar o utilizador com um aviso de contaminação/mistura de amostras. O lote irá ser invalidado e não é produzido qualquer relatório. (Aplicável ao software de servidor v2.2 e superior do VeriSeq NIPT Solution v2.)

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

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

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

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

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



ATENÇÃO

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

Caraterísticas de desempenho

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

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

Estudo clínico

A precisão clínica do VeriSeq NIPT Solution v2 foi demonstrada através da avaliação de amostras de plasma de mulheres grávidas com gestações unifetais e de gémeos. As amostras foram obtidas a partir de um banco de amostras de plasma não identificadas, anteriormente processadas a partir de amostras de sangue total periférico. Foram consideradas mais de 45 000 amostras para inclusão no estudo. Estas amostras foram sujeitas a exames pré-natais prévios para detetar aneuploidias fetais dos cromossomas e deleções e duplicações parciais de 7 Mb ou mais. Todas as amostras de gestações afetadas e um subconjunto de amostras consecutivas de gestações não afetadas foram elegíveis para serem testadas, caso os resultados clínicos estivessem disponíveis e fossem cumpridos os critérios da amostra. Foram incluídas no conjunto de testes de análise 2335 amostras no total. Deste conjunto, 2328 amostras eram de gestações unifetais e sete amostras eram de gestações de gémeos.

Destas amostras, 28 (1,2%, 28/2335) amostras falharam o controlo de qualidade do ensaio na primeira passagem durante a análise dos dados de sequenciação concluídos:

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

Dados demográficos e características da gestação

A [Tabela 7](#) apresenta um resumo da idade materna, idade gestacional e trimestre de gestação, para as amostras do rastreio genómico amplo, incluindo amostras de mosaicismo conhecidas. A maioria (98%) das amostras testadas representam gestações de primeiro trimestre.

Os dados demográficos das coortes dos rastreios básicos e genómicos amplos foram avaliados e comparados, não revelando qualquer diferença estatística. Os dados demográficos e as características da gestação eram semelhantes independentemente da inclusão ou exclusão de mosaicos conhecidos.

Tabela 7 Dados demográficos e características da gestação

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

* As amostras finais apresentadas continham 7 gémeos.

Desempenho clínico

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

Os métodos de análise cromossômica incluíram a cariotipagem, a hibridização fluorescente in situ (FISH) ou a hibridização genómica comparativa por microarrays cromossômicos (CMA). A análise cromossômica foi realizada em sangue periférico ou saliva de recém-nascidos ou bebés, amostras de produtos de concepção (POC), amniócitos, vilosidades coriônicas, tecidos placentários ou sangue do cordão umbilical pós-parto.

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

Desempenho do rastreio básico

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

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

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

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

Desempenho do rastreio genómico amplo

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

Desempenho do rastreio genómico amplo em qualquer anomalia

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

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

Desempenho do rastreio genómico amplo em aneuploidia autossómica rara

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

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

Desempenho do rastreio genómico amplo em deleções e duplicações parciais

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

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

Diferenças no desempenho entre o rastreio básico e o rastreio genómico amplo

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

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

Inclusão de mosaicos no rastreio genómico amplo

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

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

Deleção ou duplicação parcial versus deteção de aneuploidia em cromossoma inteiro

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

Ao utilizar o rastreio genómico amplo, nos casos em que tanto um evento de cromossoma inteiro como um evento de CNV no mesmo cromossoma excede o limite da LLR, o sistema dá precedência de comunicação a um evento de duplicação ou deleção parcial em detrimento da identificação de um cromossoma inteiro se o tamanho da duplicação ou deleção parcial abranger cerca de 75% ou menos do cromossoma no qual o evento é detetado. Se a região de duplicação ou deleção parcial detetada for superior a 75% do tamanho do cromossoma, o evento é reportado como monossomia ou trissomia total de todo o cromossoma, se o limite da LLR do cromossoma inteiro for também simultaneamente excedido. Por este motivo, duplicações ou deleções substancialmente grandes, e que sejam iguais ou inferiores a 75% do tamanho do cromossoma, podem ser indicativas de uma aneuploidia do cromossoma inteiro.

Em todas as amostras, a pontuação LLR da classificação do cromossoma inteiro está disponível no relatório complementar. A pontuação LLR deve ser revista a respeito do limite especificado na [Figura 2](#) antes de interpretar o resultado. Por exemplo, uma identificação da CNV em que as pontuações LLR ao nível do cromossoma que ultrapassam o limite fornecem mais suporte para uma interpretação consistente com uma aneuploidia do cromossoma inteiro; consulte a [Tabela 12](#) para obter um exemplo.

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

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

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

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

Cromossomas sexuais

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

Tabela 13 Concordância percentual para classificação sexual fetal*

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

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

** Outros resultados citogenéticos foram XXXXX e XXYY.

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

O valor preditivo positivo (VPP) e o valor preditivo negativo (VPN) do teste fornecem informações sobre a capacidade do teste para fundamentar decisões clínicas com base na sensibilidade e na especificidade do teste, e testar previamente a probabilidade de um feto ser afetado por trissomia (prevalência). Uma vez que o VPP e o VPN dependem da prevalência e que a prevalência destas aneuploidias pode variar em diferentes populações de indivíduos, o VPP e o VPN foram calculados num intervalo de valores de prevalência plausíveis, com base nos valores de sensibilidade e especificidade observados no rastreio básico (sem mosaicos conhecidos) do estudo de precisão clínica. A [Tabela 17](#) baseia-se no rastreio genómico amplo (com mosaicos conhecidos).

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

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

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

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

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

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

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

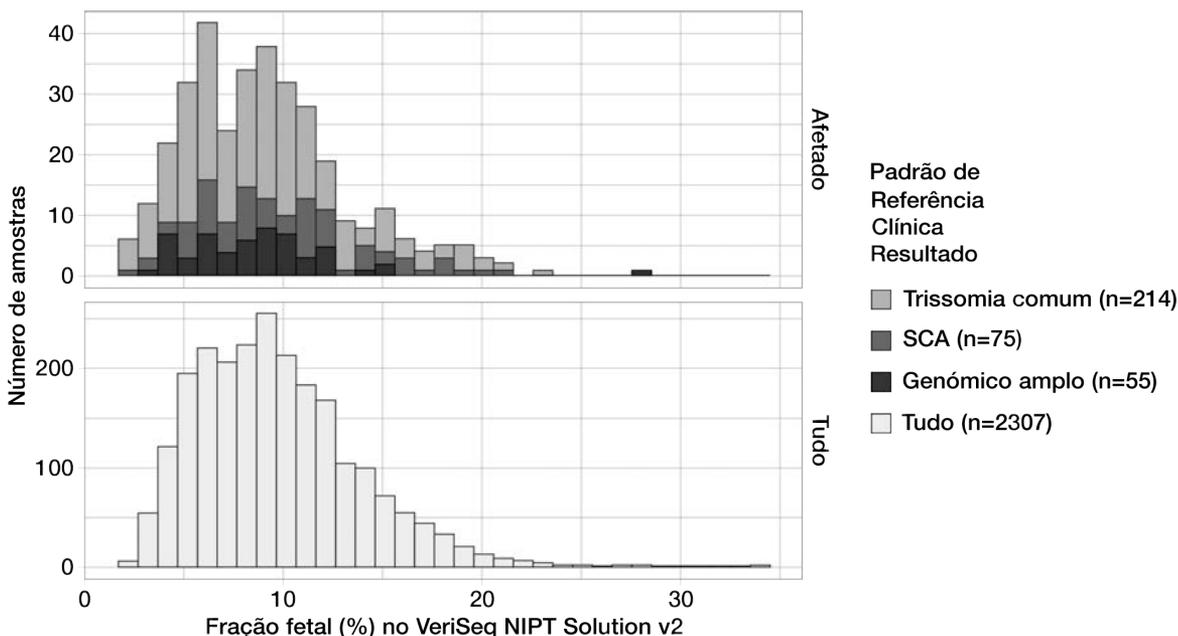
Prevalência (%)	VPP (%)	VPN (%)
0,01	1,42	> 99,99
0,02	2,81	> 99,99
0,05	6,74	> 99,99

Prevalência (%)	VPP (%)	VPN (%)
0,10	12,64	> 99,99
0,20	22,45	99,99
0,50	42,07	99,98
1,00	59,34	99,95
1,50	68,75	99,93
2,00	74,68	99,91

Distribuição da fração fetal

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

Figura 1 Distribuição da fração fetal



5 amostras tinham anomalias em várias categorias.

A trissomia comum inclui amostras com trissomia 21, 18 e/ou 13.

O teste genómico amplo inclui as amostras com RAA ou duplicações e/ou deleções parciais.

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

Desempenho em gestações de gémeos

Estimativa do desempenho em gestações de gémeos para trissomia 13, 18 e 21 e cromossoma Y

Devido à baixa prevalência de trissomia 21, 18 e 13 em gestações de gémeos, só estava disponível para o estudo clínico um pequeno número de amostras de gémeos afetadas. Para estimar o desempenho do VeriSeq NIPT Solution v2 em gestações de gémeos, foram utilizados modelos *in silico* baseados em observações de amostras clínicas para simular populações de gestações de gémeos. Esta simulação foi consistente com a população visada. A distribuição da fração fetal foi determinada através de cerca de 4500 amostras de gémeos e foi comparada com a distribuição de cerca de 120 000 amostras unifetais. A distribuição da fração fetal condicionada ao estado de aneuploidia foi determinada a partir de supostas identificações de gestações unifetais (1044 trissomia 21, 307 trissomia 18 e 192 trissomia 13). Combinar as duas distribuições permitiu inferências de deteção de aneuploidia em gémeos. Foram simulados conjuntos de gémeos dizigóticos e monozigóticos, e foi obtida uma média ponderada representativa da sua prevalência na população visada (2 dizigóticos: 1 monozigótico) para estimar a sensibilidade. Para a especificidade, foram simulados conjuntos de gémeos não afetados.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Desempenho analítico

Precisão

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

- Estudo multicêntrico de reprodutibilidade que incluiu três ensaios por três operadores em três locais, com um único lote de reagente para um total de nove ensaios.
- Estudo de precisão no laboratório que incluiu 12 ensaios num único local utilizando dois ML STAR, dois sistemas de instrumentos de sequenciação e três lotes de reagente de sequenciação.

O objetivo do estudo de precisão era quantificar a precisão do ensaio relativamente à trissomia 21 (T21) e ao cromossoma Y e estimar a variabilidade entre diferentes instrumentos, kits de preparação de bibliotecas e lotes de reagentes de sequenciação. A reprodutibilidade para condições não descritas acima não foi avaliada como parte dos estudos.

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

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

A média e os desvios padrão observados para a pontuação LLR do cromossoma 21 e os valores cromossómicos normalizados (NCV) do cromossoma Y mostraram que o desvio padrão (DP) das réplicas era a maior fonte de variabilidade. A variação entre os locais, instrumentos e lotes de reagente adicionou uma quantidade insignificante de variabilidade, conforme demonstrado pela diferença entre o DP total e o DP das réplicas na [Tabela 19](#) e na [Tabela 20](#).

Tabela 19 Resumo do desvio padrão (DP) da resposta de sequenciação do estudo multicêntrico (reprodutibilidade)

Resposta	N	Média	DP das réplicas	DP total da reprodutibilidade*
Pontuação LLR do cromossoma 21	36	34,43	11,36	11,36

Resposta	N	Média	DP das réplicas	DP total da reprodutibilidade*
NCV do cromossoma Y	180	190,56	7,96	10,20

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

Tabela 20 Resumo da precisão da resposta de sequenciação no laboratório

Resposta	N	Média	DP das réplicas	DP total no laboratório*
Pontuação LLR do cromossoma 21	48	36,01	9,07	10,25
NCV do cromossoma Y	240	198,68	7,63	7,82

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

Foi realizado um estudo adicional para comparar a precisão de sequenciação do VeriSeq NIPT Solution v2 (desvio padrão total) utilizando a versão 2.0 de uma célula de fluxo versus a versão 2.5. O estudo incluiu dois tipos de células de fluxos (v2.0 e v2.5), três lotes de kits de sequenciação, quatro sistemas de instrumentos e dois ensaios de sequenciação por combinação para um total de 48 ensaios num único centro. Foi preparado um pool de sequenciação a partir de placas de cfDNA que foram manualmente preparadas. O painel de amostras incluiu 4 réplicas do pool de amostras afetadas por T21 com 5% de fração fetal e 20 réplicas do pool de cfDNA materno-masculino (feto XY) com 10% de fração fetal. Os resultados do estudo são apresentados na [Tabela 21](#) e suportam a evidência de que não há diferença na precisão de sequenciação ao utilizar a célula de fluxo v2.0 versus a célula de fluxo v2.5.

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

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

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

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

Contaminação cruzada

A contaminação cruzada foi avaliada no fluxo de trabalho de preparação de amostras do VeriSeq NIPT Solution. Foram testados pools de plasma de mulheres não grávidas (XX) e homens adultos (XY) num padrão quadriculado no formato de placa de 96 poços em 4 placas. N = 48 cada para as amostras femininas e masculinas por placa, para um total de 192 amostras femininas e 192 amostras masculinas. Nenhuma das

amostras femininas demonstrou uma cobertura do cromossoma Y estatisticamente superior à estimativa inicial, não indicando qualquer contaminação cruzada por parte das amostras masculinas na mesma placa. Não foi observada qualquer contaminação cruzada detetável no VeriSeq NIPT Solution.

Substâncias potencialmente interferentes

O impacto de substâncias potencialmente interferentes foi avaliado no VeriSeq NIPT Solution avaliando o desempenho do ensaio na presença de tais substâncias.

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

Tabela 22 Substâncias potencialmente interferentes (endógenas)

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

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

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

Tabela 23 Substâncias potencialmente interferentes (exógenas)

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

Limite de deteção

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

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

- Fração fetal
- Profundidade de sequenciação
- Tamanho e complexidade da região genómica de interesse

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

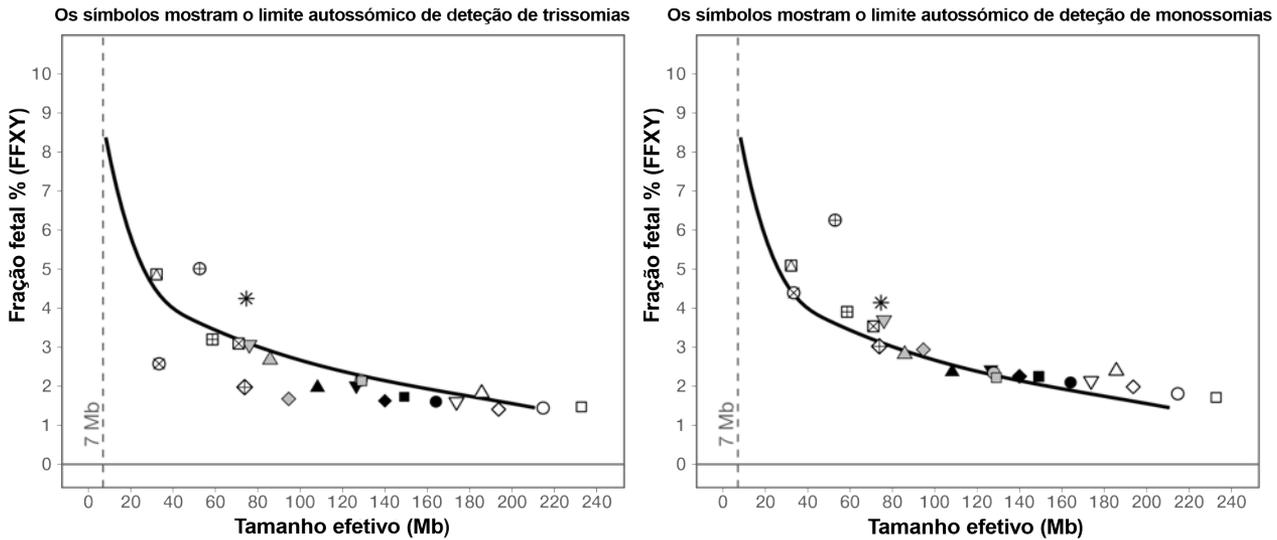
Para determinar o LOD para a deteção de T21, foram analisadas amostras contendo misturas de amostras de pool de T21 e amostras de pool não afetadas. Os dois tipos de analito foram misturados através de uma série de titulação para criar um conjunto de sete níveis de fração fetal (0, 2, 3, 4, 5, 6 e 10%).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

Para aumentar mais a resolução da grelha de fração fetal da análise do LOD, os dados deste estudo foram acrescidos com dados obtidos a partir de uma diluição *in silico*. Os efeitos da titulação e diluição experimentais foram simulados através da mistura controlada dos dados de sequenciação. Os dados desta titulação *in silico* abrangeram um conjunto de 14 níveis de fração fetal (1,25; 1,50; 1,75; 2,00; 2,25; 2,50; 2,75; 3,00; 3,25; 3,50; 3,75; 4,00; 4,25 e 4,50%) com 32 réplicas para cada nível. Uma análise de probit foi aplicada aos dados resultantes para determinar o LOD para T21.

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

A [Figura 2](#) apresenta a probabilidade de deteção de 95% para a média de regiões por tamanho e os limites de deteção autossómicos para todas as trissomias e monossomias. Limite da LLR da CNV 15,1.

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



Cr	Símbolo	Trissomia		Monossomia	
		Limite da LLR	LoD (%)	Limite da LLR	LoD (%)
1	○	7	1,44	13,2	1,80
2	□	9	1,47	13,6	1,71
3	◇	5	1,41	13,8	1,99
4	△	7	1,82	15,2	2,39
5	▽	7,6	1,60	17	2,14
6	●	7,3	1,60	15,4	2,09
7	■	6,6	1,73	14	2,25
8	◆	5,8	1,63	14,8	2,25
9	▲	8	1,97	13,6	2,37
10	▼	8,8	2,01	14,7	2,42
11	●	12,2	2,14	15,7	2,35

Cr	Símbolo	Trissomia		Monossomia	
		Limite da LLR	LoD (%)	Limite da LLR	LoD (%)
12	■	11,6	2,14	12,8	2,22
13	◇	3	1,68	16,5	2,94
14	△	12,7	2,68	14,7	2,82
15	▽	9,8	3,07	16,4	3,69
16	⊠	10,7	3,10	15,3	3,54
17	*	16,8	4,25	15,7	4,14
18	⊕	3	1,98	11,3	3,02
19	⊕	15,5	5,01	27,5	6,26
20	⊞	10,6	3,20	18,2	3,91
21	⊗	2,5	2,58	13,2	4,40
22	⊠	13,5	4,87	15,3	5,09

Resolução de problemas

Resolução de problemas do VeriSeq NIPT Solution v2

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

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

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

Modo de falha	Resultado possível	Interpretação	Ação recomendada	Comentários
Quantification QC failure (Falha do controlo de qualidade de quantificação)	Falha no ensaio de quantificação. Mediana de lote abaixo do mínimo	Processo de produção insuficiente.	Repita a quantificação. Se a repetição falhar, contacte o Suporte Técnico da Illumina.	As métricas de curva padrão não aprovadas indicam problemas com a preparação de bibliotecas (ou seja, utilização de etanol de grau não biológico) ou problemas com o processo de quantificação.
	Falha no ensaio de quantificação	Falha da curva padrão.	Repita a quantificação. Se a repetição falhar, contacte o Suporte Técnico da Illumina.	
Pooling failure (Falha no pooling)	Falha ao concluir o pooling de amostras	A análise do pooling não conseguiu calcular os volumes adequados de pool.	Reavalie a concentração de pool alvo. Repita a análise do pooling.	

Resolução de problemas do VeriSeq NIPT Microlab STAR

Passo do processo	Código de erro	Caixa de diálogo do erro	Descrição	Resolução por parte do utilizador
Criação de lotes	EM0044	The Batch ID entered contains forbidden characters. (O ID do lote introduzido contém caracteres proibidos).	O VeriSeq NIPT Solution v2 só aceita caracteres de números, letras, sublinhado e traços em todos os campos de dados.	Atribua um nome ao lote que não contenha caracteres especiais.

Passo do processo	Código de erro	Caixa de diálogo do erro	Descrição	Resolução por parte do utilizador
Criação de lotes	EM0051	The Batch ID is greater than 36 characters in length. (O ID do lote é superior a 36 caracteres.)	O VeriSeq NIPT Solution v2 limita o comprimento dos nomes de lote a 36 caracteres ou menos.	Atribua um nome ao lote com menos de 36 caracteres.
Criação de lotes	EM0076	Unable to connect to VeriSeq Onsite Server v2 (Não foi possível ligar ao VeriSeq Onsite Server v2)	O VeriSeq Onsite Server v2 deixou de responder aos pedidos de dados do Workflow Manager (Gestor de fluxo de trabalho).	<ol style="list-style-type: none"> 1. Certifique-se de que o ML STAR está ligado à rede. 2. Certifique-se de que o VeriSeq Onsite Server v2 está ligado. 3. Verifique se é possível ligar o ML STAR ao VeriSeq Onsite Server v2 (através de pedido de ping). 4. Se os passos anteriores não resolverem o problema, contacte o Suporte Técnico da Illumina.
Criação de lotes	EM0118	This batch has been failed and cannot be further processed. (Este lote falhou e não pode ser processado.)	O lote especificado já falhou e não pode continuar a ser processado.	O registo do lote no VeriSeq Onsite Server v2 indica que o lote selecionado falhou. Não é permitido continuar a processá-lo. Crie outro lote com as amostras necessárias.
Criação de lotes	Não aplicável	This batch has already completed processing. Would you like to repool? (Este lote já concluiu o processamento. Pretende repetir o pool?)	O lote indicado foi processado através de pooling. O único processamento permitido é a repetição do pool.	<p>Repita o pool da seguinte forma.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Selecione Re-Pool (Repetir pool). • Aborte o método e certifique-se de que o nome do lote está correto antes de repetir o pool.

Passo do processo	Código de erro	Caixa de diálogo do erro	Descrição	Resolução por parte do utilizador
Isolamento do plasma	WP0087	Duplicate sample barcodes loaded. (Foram carregados códigos de barras de amostras duplicados.)	Foram carregadas no sistema amostras com códigos de barras idênticos.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Siga as instruções do Workflow Manager (Gestor de fluxo de trabalho) para identificar as amostras duplicadas. 2. Remova os duplicados e volte a etiquetar ou substitua-os. 3. Volte a carregar as amostras.
Isolamento do plasma	EP0102	Samples specified in the Sample Sheet were not loaded. (As amostras especificadas na ficha de amostras não foram carregadas.)	As amostras incluídas na ficha de amostras não foram incluídas nos códigos de barras carregados.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Siga as instruções do Workflow Manager (Gestor de fluxo de trabalho) para identificar as amostras em falta. 2. Efetue uma das seguintes opções: <ul style="list-style-type: none"> • Adicione as amostras em falta ao lote e volte a carregar as amostras. • Interrompa o método e modifique a ficha de amostras conforme necessário. Reinicie o método.
Carregamento de placas	Não aplicável	Venus Barcode Mask Error (Erro de máscara de código de barras Venus)	O Workflow Manager (Gestor de fluxo de trabalho) executa a associação correta placa-lote com as máscaras de código de barras Venus.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Verifique a colocação da placa para confirmar que a disposição da placa está correta. 2. Certifique-se de que a placa carregada é a placa correta para o lote indicado.

Passo do processo	Código de erro	Caixa de diálogo do erro	Descrição	Resolução por parte do utilizador
Extração de cfDNA	WE0150	Pressure in the vacuum chamber is too low. (A pressão na câmara de vácuo é demasiado baixa.)	O Workflow Manager (Gestor de fluxo de trabalho) não continua se o sensor de pressão da linha de vácuo em repouso for < 400 Torr.	<ol style="list-style-type: none">1. Verifique se existem dobras ou outras obstruções na linha de vácuo.2. Abra os grampos de desengate da linha de resíduos, deixe sair a pressão e, em seguida, feche totalmente os grampos de desengate da linha.3. Certifique-se de que o controlador de vácuo e a bomba estão ligados.4. Verifique o frasco de resíduos de vácuo. Se o frasco de resíduos está mais de meio cheio, esvazie o frasco de resíduos.5. Se o problema persistir, contacte o Suporte Técnico da Illumina.
Extração de cfDNA	WE0153	Pressure in the vacuum chamber is too high. (A pressão na câmara de vácuo é demasiado alta.)	Se a pressão de vácuo medida estiver demasiado alta antes de o controlo de pressão ser iniciado, o sistema pode funcionar incorretamente.	Na parte de trás do controlador, certifique-se de que todas as ligações e linhas de vácuo estão fixas.

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

Passo do processo	Código de erro	Caixa de diálogo do erro	Descrição	Resolução por parte do utilizador
Extração de cfDNA	WM0219	If Vacuum is on, manually rest the pump. (Se o vácuo estiver ligado, coloque a bomba em repouso manualmente.)	O vácuo pode ficar ligado após interromper um método durante a extração.	<ol style="list-style-type: none"> 1. No controlador de vácuo, prima o botão Power (Alimentação) para desligar o vácuo. 2. Aguarde 10 segundos e, em seguida, prima o botão Power (Alimentação) novamente para ligar o vácuo.
Extração de cfDNA	EE0477	An error has occurred while moving a plate. (iSWAP error) (Ocorreu um erro ao mover uma placa [erro iSWAP].)	Se ocorrer um erro iSWAP (queda da placa, falha ao pegar, etc.), o sistema solicita-lhe que conclua o movimento da placa manualmente.	<p>Certifique-se de que é possível recuperar a placa (sem material derramado).</p> <ul style="list-style-type: none"> • Se não for possível recuperar a placa, interrompa o ensaio. • Se for possível recuperar a placa, siga as instruções apresentadas para concluir a transferência da placa manualmente.
Extração de cfDNA	EE0519	Scanned barcode does not match Binding Plate barcode on record. (O código de barras lido não corresponde ao código de barras da placa de ligação no registo.)	A placa de ligação carregada não corresponde ao código de barras da placa removida.	Certifique-se de que a placa carregada corresponde ao código de barras registado (consulte o registo de traçado do código de barras esperado).

Passo do processo	Código de erro	Caixa de diálogo do erro	Descrição	Resolução por parte do utilizador
API	EA0372	Unable to connect to the data server. (Não foi possível ligar ao servidor de dados.)	O VeriSeq Onsite Server v2 deixou de responder aos pedidos de dados do Workflow Manager (Gestor de fluxo de trabalho).	1. Certifique-se de que o ML STAR está ligado à rede. 2. Certifique-se de que o VeriSeq Onsite Server v2 está ligado. 3. Verifique se é possível ligar o ML STAR ao VeriSeq Onsite Server v2 (através de pedido de ping).
	EA0774	Connection Error The API server connection failed to validate. (Erro de ligação. A validação da ligação ao servidor API falhou.)	O VeriSeq Onsite Server v2 deixou de responder aos pedidos de dados do Workflow Manager (Gestor de fluxo de trabalho).	Certifique-se de que: 1. Certifique-se de que o ML STAR está ligado à rede. 2. Verifique se é possível ligar o ML STAR ao VeriSeq Onsite Server v2 (através de pedido de ping). 3. Certifique-se de que o VeriSeq Onsite Server v2 está ligado.
	EA0780	403: Invalid Request The current transaction is not valid. (403: Pedido inválido. A transação atual não é válida.)	Os dados enviados violam a lógica do fluxo de trabalho do sistema.	Consulte os detalhes do erro para obter mais informações. As causas comuns envolvem dados demasiado longos ou que violam a lista de caracteres aceitáveis.

Referências

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

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

Histórico de revisões

Documento	Data	Descrição da alteração
Documento n.º 1000000078751 v09	Abril de 2024	<p>Removido</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ref.ª 20030577 obsoleta. • Requisito de capacidade máxima de tubos para centrífuga para tubos de colheita de sangue. <p>Adicionado</p> <ul style="list-style-type: none"> • Nova ref.ª 20101927 ao VeriSeq Onsite Server v2. • Unidade de dimensão para os tubos de colheita de sangue de 10 ml. • Esclarecimento sobre as versões compatíveis do SoftMax Pro. • Nota de esclarecimento para declarar que apenas devem ser utilizadas peças de plástico compatíveis para assegurar a intermutabilidade com o VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Nota relativa ao aviso de contaminação/mistura de amostras à secção Interpretação dos resultados. • Declaração de atenção para não congelar amostra de sangue total colhida no tubo Streck Cell-Free DNA BCT. • Declaração de atenção para evitar a exposição de amostras a temperaturas elevadas. • Esclarecimento relativo às condições de reprodutibilidade e limitações do ensaio. • Esclarecimento relativo ao Limite da LLR da CNV na Figure 2 da secção Limite de deteção. <p>Atualizado</p> <ul style="list-style-type: none"> • Referência à tina de reagentes compatível da Roche Reagent Tub para a Illumina Reagent Tub e nova referência adicionada. • Referência do Thermo Fisher Multifuge X4 Pro-MD para ref.ª 75016034. • Declaração de atenção sobre os volumes de poços inconsistentes poderem fazer com que as amostras falhem o CQ automatizado. • Referência a folhetos informativos dos instrumentos.
Documento n.º 1000000078751 v08	Agosto de 2022	<p>Atualização da referência do fluxo de trabalho</p> <p>Remoção da instrução de pipetar para misturar se a placa das bibliotecas estivesse congelada.</p>

Documento	Data	Descrição da alteração
Documento n.º 1000000078751 v07	Maio de 2022	<p>Divisão da secção Limitações do procedimento em Relatórios do VeriSeq NIPT Solution v2 e inclusão dos primeiros dois pontos. Texto restante sob um novo título Limitações do ensaio.</p> <p>Removido</p> <ul style="list-style-type: none"> • VeriSeq de todas as etiquetas de reagentes. • Aplicação de um código de barras de placa à placa adaptadora do VeriSeq NIPT na preparação das bibliotecas. <p>Adicionado</p> <ul style="list-style-type: none"> • A palavra "certificada" à água sem DNase/RNase. • Um dos seguintes leitores de microplacas, ou equivalente, e SpectraMax M2, M3, M4, M5, e a nota. • À secção VeriSeq NIPT Microlab STAR para explicar o que fazer durante um evento de erro ao manusear. • Uma nota para inspecionar visualmente os poços. • Instruções para lotes de 24 e 48 amostras durante as secções do protocolo. • Passos para quando utilizar a placa adaptadora roxa ou equivalente. • Texto na secção Dados demográficos e características da gestação para incluir os resultados do primeiro trimestre de gestação. • Um ponto nas especificações das placas de poços profundos para incluir resistência à torção. <p>Atualizado</p>
		<ul style="list-style-type: none"> • Texto para nomes únicos de lotes por uma questão de clareza e inclusão de um exemplo. • Símbolos e formatação para Notas, Atenções e Avisos. • Resultados dos sub-pontos do teste. • Tiocianato de guanidina para cloridrato de guanidina. • CVS para BVS (sistema de vácuo básico) • Texto para a utilização do rastreio genómico amplo e pontuação LLR. • Especificações: Especificações da tina de reagentes, placas de poços profundos, placas de 384 poços, placas de 96 poços
Documento n.º 1000000078751 v06	Agosto de 2021	Atualização da morada do representante autorizado na UE.

Documento	Data	Descrição da alteração
Documento n.º 1000000078751 v05	Dezembro de 2020	<p>Atualização das secções Princípios do procedimento, Avisos e precauções e Etiquetas do produto com esclarecimentos adicionais de forma a cumprir os requisitos regulamentares. Pequenas atualizações no conteúdo do protocolo para corresponder ao estilo e organização atuais da Illumina. Correção da descrição do cromossoma 21 de "o segundo autossoma humano mais pequeno" para "o autossoma humano mais pequeno" na secção Precisão do Desempenho analítico. Adição de declarações de atenção para abordar a utilização incorreta de reservatórios e riscos de junção de amostras nas secções de Preparação de plasma isolado e Interpretação dos resultados.</p> <p>Adição de novas referências do servidor e software para a publicação de um novo modelo de servidor e atualizações de referências do software.</p> <p>Adição de precauções ao protocolo e informações de resolução de problemas para abordar o impedimento de transbordos de amostra.</p> <p>Atualização dos ingredientes ativos no reagente padrão de quantificação de ADN na Caixa de acessórios para estar de acordo com a ficha de dados de segurança.</p> <p>Atualização das convenções de atribuição de nomes do Local Run Manager VeriSeq NIPT Module para fins de consistência com outra documentação.</p> <p>Adição do histórico de revisões.</p>
Documento n.º 1000000078751 v04	Outubro de 2020	Pequenas correções.
Documento n.º 1000000078751 v03	Setembro de 2020	Atualização da lista de materiais para apresentar as especificações do material de laboratório em conjunto com as opções compatíveis conhecidas.

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

Patentes e marcas comerciais

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

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

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

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

© 2024 Illumina, Inc. Todos os direitos reservados.

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

Informações de contacto



Illumina, Inc.
5200 Illumina Way
San Diego, Califórnia 92122 EUA
+1 800 809 ILMN (4566)
+1 858 202 4566 (fora da América do Norte)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



Promotor australiano

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

Etiquetas do produto

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

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