

Folheto informativo

PARA USO EM DIAGNÓSTICO IN VITRO.

Uso previsto

O VeriSeq NIPT Solution v2 é um teste de diagnóstico *in vitro* para ser usado no rastreamento genômico amplo para a detecção de anomalias genéticas no feto com base em amostras de sangue total periférico de gestantes com pelo menos 10 semanas de gestação. O VeriSeq NIPT Solution v2 usa o sequenciamento completo do genoma para detectar duplicações e deleções parciais em todos os autossomos e a condição de aneuploidia em todos os cromossomos. O teste oferece uma opção para solicitar o relato de aneuploidia dos cromossomos sexuais (ACS). Esse produto não deve ser usado como a única base para o diagnóstico ou para outras decisões relativas à conduta na gestação.

O VeriSeq NIPT Solution v2 inclui: o VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 para o VeriSeq NIPT Microlab STAR VeriSeq NIPT Sample Prep Kit e o VeriSeq Onsite Server v2 com o VeriSeq NIPT Assay Software v2. O VeriSeq NIPT Solution v2 deve ser usado com um sequenciador de última geração.

Resumo e explicação do ensaio

Anomalias cromossômicas fetais, especialmente aneuploidia, que é um número anormal de cromossomos, são uma causa comum de falha reprodutiva, anomalias congênitas, atraso no desenvolvimento e incapacidades intelectuais. A aneuploidia afeta aproximadamente 1 em cada 300 nascidos vivos, com índices muito mais elevados associados a abortos e natimortos.^{1,2} Até há pouco tempo, havia dois tipos de testes pré-natais para essas doenças: testes de diagnóstico ou de rastreamento. Os testes de diagnóstico envolvem procedimentos invasivos, como a amniocentese ou a biópsia das vilosidades coriônicas. Esses métodos de teste são considerados o padrão ouro para a detecção de aneuploidia fetal. No entanto, eles estão associados a um risco de abortamento espontâneo entre 0,11% e 0,22%.³ Os testes convencionais de rastreamento de múltiplos marcadores não têm risco de perda fetal, pois não são invasivos, mas são menos precisos do que os testes de diagnóstico. Seus índices de detecção de trissomia 21 variam entre 69–96%, dependendo do rastreamento em particular, da idade materna e da idade gestacional no momento do teste.⁴ É importante observar que eles têm índices de falsos-positivos de aproximadamente 5%, o que pode levar a um teste de diagnóstico invasivo para confirmação e, portanto, ao risco de perda fetal relacionada ao procedimento.⁴ O rastreamento por ultrassonografia também pode detectar anomalias cromossômicas, mas com exatidão ainda menor que a desses outros métodos.

A aneuploidia fetal dos cromossomos 21, 18, 13, X e Y pode ser detectada com um grau de precisão elevado por meio de um teste pré-natal não invasivo (NIPT) usando sequenciamento de genoma completo ou DNA livre de células (cfDNA) obtido de plasma materno com gestação de 10 semanas ou mais. Uma metanálise recente de vários estudos clínicos relatou os seguintes índices de detecção ponderados agrupados e especificidades para

trissomias do 21 e do 18 em gestações únicas: trissomia 21 99,7% e 99,96% e trissomia 18 97,9% e 99,96%, respectivamente.⁵ Um estudo sugere que o uso de NIPT como rastreamento primário em todas as gestações pode resultar em uma redução de 89% no número de procedimentos invasivos confirmatórios.⁶

Graças à significativa redução dos índices de falsos-positivos com o NIPT em comparação com o rastreamento de múltiplos marcadores, numerosas organizações médicas profissionais emitiram pareceres dando suporte a várias indicações para o uso de NIPT.

Especificamente, a International Society for Prenatal Diagnosis, o American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG)/Society for Maternal Fetal Medicine (SMFM), o American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) e a European Society of Human Genetics/American Society of Human Genetics apoiam a oferta de NIPT a todas as gestantes.^{7,8,9} São recomendados aconselhamento pré-teste, consentimento esclarecido e testes de diagnóstico para confirmar um resultado positivo de cfDNA.⁴

O VeriSeq NIPT Solution v2 é um teste de diagnóstico in vitro (IVD) não invasivo que utiliza sequenciamento de genoma completo de fragmentos de cfDNA originários de amostras de sangue total periférico de gestantes com pelo menos 10 semanas de gestação. O teste oferece duas opções de rastreamento: básico e genômico amplo. O rastreamento básico fornece informações sobre a condição de aneuploidia somente dos cromossomos 21, 18, 13, X e Y. O rastreamento genômico amplo informa duplicações e deleções parciais de todos os autossomos e a condição de aneuploidia de todos os cromossomos. Ambos os tipos de rastreamento dão opção de informações de aneuploidia do cromossomo sexual (ACS) com ou sem informações do sexo fetal. A opção de informações da ACS pode ser desativada. Se a opção de informações da ACS for desativada, o sexo fetal também não será informado. Para obter mais informações sobre as opções de informações sobre sexo, consulte o *Guia do software VeriSeq NIPT Solution v2 (documento n.º 1000000067940)*.

Princípios do procedimento

O VeriSeq NIPT Solution v2 é uma solução automatizada para exames NIPT em laboratório que consiste na preparação automatizada de amostras e na análise de dados de sequenciamento. Os kits VeriSeq NIPT Sample Prep são reagentes especializados para uso único, utilizados junto com o VeriSeq NIPT Microlab STAR para preparar lotes de 24, 48 ou 96 amostras para sequenciamento de última geração. Os dados de sequenciamento de genoma completo tipo paired-end 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: coleta de amostras, isolamento de plasma, extração de cfDNA, preparação de bibliotecas, quantificação de bibliotecas, pooling de bibliotecas, sequenciamento e análise, que são descritos em mais detalhes:

- **Coleta de amostras** — 7–10 mL de sangue total periférico materno são colhidos em um tubo de coleta de sangue (BCT) de DNA livre de células Streck que evita lise celular e contaminação genômica e estabiliza o sangue total.
- **Isolamento de plasma** — Até 5 dias após a coleta, o plasma é isolado do sangue total periférico materno por técnicas de centrifugação padrão. O VeriSeq NIPT Microlab STAR aspira e distribui o plasma em uma

placa de 96 poços profundos para processamento subsequente. Caso seja necessário repetir um teste, as amostras pós-processamento podem ser novamente tampadas e armazenadas a 4°C por mais 5 dias (até um total de 10 dias após a coleta de sangue).

**CUIDADO**

Ultrapassar os tempos mencionados acima pode afetar negativamente os índices de falhas nas amostras individuais.

- **Extração de cfDNA**—A purificação de cfDNA do plasma é obtida pela adsorção em uma placa de ligação, seguida de lavagem da placa de ligação para remover contaminantes e de eluição.
- **Preparação de bibliotecas** — Os fragmentos de cfDNA purificados são submetidos a um processo de reparo das extremidades para converter saliências de 5' e 3' em extremidades cegas. Em seguida, é adicionado às extremidades 3' um nucleotídeo de desoxiadenosina para criar uma saliência de base única. Os adaptadores indexados que contêm uma saliência de base única 3' de desoxitimidina são ligados aos fragmentos de cfDNA processados. O DNA ligado é purificado com beads de imobilização reversa de fase sólida. Cada amostra de um conjunto de 24, 48 ou 96 recebe um adaptador indexado exclusivo. Os adaptadores têm duas finalidades:

**CUIDADO**

Tome muito cuidado para evitar a contaminação cruzada dos índices, o que poderia produzir resultados incorretos.

- Os índices permitem a identificação das amostras no sequenciamento subsequente.
- Os adaptadores de índice contêm sequências que permitem a captura de bibliotecas na superfície sólida de uma lâmina de fluxo de sequenciamento para clusterização e sequenciamento subsequente.
- **Quantificação** — O produto da biblioteca é quantificado por meio de um corante fluorescente com concentração determinada por comparação com uma curva de DNA padrão.
- **Pooling e sequenciamento de bibliotecas**—As bibliotecas de amostras são agrupadas em pools de 24 ou 48 amostras em quantidades ajustadas para minimizar a variação da cobertura. Cada pool é sequenciado com um sequenciador de última geração.
- O VeriSeq NIPT Solution v2 não inclui equipamento de sequenciamento e materiais de consumo.
- **Análise**—Para cada amostra, a análise consiste no seguinte:
 - Identificação de fragmentos da biblioteca por sequência de índice e alinhamento das leituras tipo paired-end em um genoma de referência humano.
 - Estimativa da fração fetal da biblioteca pela combinação das informações da distribuição dos comprimentos e das coordenadas genômicas dos fragmentos da biblioteca.
 - Depois de considerar os vieses conhecidos, um modelo estatístico detecta regiões do genoma com sub-representação ou sobre-representação na biblioteca de uma maneira consistente com uma anomalia no nível estimado da fração fetal.

- O relatório do NIPT fornece um resumo dos resultados para o menu de testes selecionado em que a mensagem ANOMALY DETECTED (ANOMALIA DETECTADA) ou NO ANOMALY DETECTED (NENHUMA ANOMALIA DETECTADA) é exibida juntamente com uma estimativa da fração fetal para amostras que são aprovadas pelo CQ.
- O Relatório suplementar fornece métricas quantitativas que caracterizam cada anomalia detectada.

Limitações do procedimento

Limitações do ensaio

- As evidências que dão suporte à sensibilidade e à especificidade do teste abrangem gestações únicas e gemelares. Estas instruções de uso não fornecem dados de sensibilidade e especificidade para gestações de trigêmeos ou de ordem superior.
- O VeriSeq NIPT Solution v2 não se destina a detectar poliploidias, como triploidia.
- O VeriSeq NIPT Solution v2 não se destina a detectar rearranjos cromossômicos equilibrados.
- O ensaio requer amostras de sangue total periférico de gestantes com pelo menos 10 semanas de gestação.
- Para triagens básicas, o VeriSeq NIPT Solution v2 testa anormalidades cromossômicas específicas. Resultados relatados como NO ANOMALY DETECTED (NENHUMA ANOMALIA DETECTADA) não eliminam a possibilidade de anormalidades nos cromossomos testados. Um resultado negativo não elimina a possibilidade de que a gestação tenha outras anormalidades cromossômicas, condições genéticas ou malformações congênitas (como defeito do tubo neural aberto).
- Para triagens genômicas amplas, grandes deleções e duplicações com menos de 75% do tamanho do cromossomo podem ser indicativas de aneuploidia de cromossomos inteiros.
- Para triagens genômicas amplas, determinadas regiões são excluídas da análise. Uma lista dessas regiões excluídas está disponível no site de suporte da Illumina. A detecção de anomalias genômicas só é realizada em regiões não excluídas.
- As informações do sexo fetal não estão disponíveis em todas as regiões devido a regulamentos locais que regem o fornecimento de informações sobre sexo.
- Com base nas evidências da literatura, os resultados da triagem baseada em DNA livre de células podem ser confundidos em decorrência de alguns fatores maternos e fetais. Alguns deles, entre outros, estão listados abaixo:
 - Mãe recentemente submetida a transfusão de sangue
 - Mãe submetida a transplante prévio de órgãos/células-tronco
 - Mãe portadora de doença autoimune
 - Mãe portadora de neoplasias (benignas e malignas)
 - Mosaicismo materno

- Variações do número de cópias da mãe
- Mosaicismo fetoplacentário/mosaicismo placentário confinado
- Morte fetal/gêmeo evanescente

Relatórios do VeriSeq NIPT Solution v2

- O VeriSeq NIPT Solution v2 é um teste de triagem e não deve ser considerado isoladamente de outros achados clínicos e resultados de testes. As conclusões sobre a condição do feto e as decisões de manejo da gestação não devem se basear somente nos resultados da triagem feita pelo NIPT.⁷
- O VeriSeq NIPT Solution v2 informa o seguinte:
 - A triagem básica testa a sobrerrepresentação dos cromossomos 13, 18 e 21.
 - A triagem genômica ampla testa a sub-representação e a sobrerrepresentação de todos os autossomos, incluindo deleções e duplicações parciais de, pelo menos, 7 Mb.
 - Em gestações únicas, com a seleção de Yes (Sim) ou SCA (ACS) como opção de informação do sexo, as seguintes anomalias dos cromossomos sexuais são relatadas: XO, XXX, XXY e XYY.
 - Em gestações únicas, com a seleção de Yes (Sim) como opção de informação do sexo, o sexo fetal é informado.
 - A presença de um cromossomo Y em gestações gemelares.

Componentes do produto

O VeriSeq NIPT Solution v2 consiste nos seguintes kits de preparação de amostras:

- VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (24 amostras) (peça n.º 20025895)
- VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (48 amostras) (peça n.º 15066801)
- VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (96 amostras) (peça n.º 15066802)

O VeriSeq NIPT Solution v2 consiste nos seguintes componentes de software:

- VeriSeq NIPT Assay Software v2 (peça n.º 20047024) pré-instalado no VeriSeq Onsite Server v2.
 - VeriSeq Onsite Server v2 (peça n.º 20028403, 20047000, 20101927) ou um VeriSeq Onsite Server existente (peça n.º 15076164 ou n.º 20016240) com upgrade para v2.
- VeriSeq NIPT Workflow Manager v2, (peça n.º 20044988), pré-instalado no VeriSeq NIPT Microlab STAR.
 - VeriSeq NIPT Microlab STAR (peça n.º Hamilton Company Reno: 95475-01 (115 V) & 95475-02 (230 V), Hamilton Company Bonaduz: 806288).
- Módulo Local Run Manager VeriSeq NIPT (peça n.º 20044989)

Reagentes

Reagentes fornecidos

A Illumina fornece os seguintes reagentes: VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (24 amostras) (peça n.º 20025895), VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (48 amostras) (peça n.º 15066801) e VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (96 amostras) (peça n.º 15066802). Os kits VeriSeq NIPT Sample Prep são configurados para uso com o VeriSeq NIPT Microlab STAR (ML STAR) (peça n.º 95475-01, 95475-02 ou 806288), fornecido pela Hamilton Company.

VeriSeq NIPT Sample Prep Kit, caixa de extração

Tabela 1 Caixa de extração do VeriSeq NIPT (24) e (48), peças n.º 20025869 e 15066803

Nome do reagente na etiqueta	Número de receptáculos no kit	Ingredientes ativos	Armazenamento
Tampão de lise	1	Cloreto de guanidina em solução aquosa tamponada	15°C a 30°C
Tampão de limpeza I	1	Cloreto de guanidina e álcool isopropílico em solução aquosa tamponada	15°C a 30°C
Tampão de limpeza II	1	Sais com solução aquosa tamponada	15°C a 30°C
Tampão de eluição	1	Solução aquosa tamponada	15°C a 30°C
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 Caixa de extração (96) do VeriSeq NIPT, peça n.º 15066807

Nome do reagente na etiqueta	Número de receptáculos no kit	Ingredientes ativos	Armazenamento
Tampão de lise	1	Cloreto de guanidina em solução aquosa tamponada	15°C a 30°C
Tampão de limpeza I	1	Cloreto de guanidina e álcool isopropílico em solução aquosa tamponada	15°C a 30°C
Tampão de limpeza II	2	Sais com solução aquosa tamponada	15°C a 30°C
Tampão de eluição	1	Solução aquosa tamponada	15°C a 30°C
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, caixa de preparação de bibliotecas

Tabela 3 Caixa de preparação de bibliotecas do VeriSeq NIPT (24) e (48), peças n.º 20026030 e 15066809

Nome do reagente na etiqueta	Número de receptáculos no kit	Ingredientes ativos	Armazenamento
Mistura de reparo de extremidades	1	DNA polimerase e dNTPs em solução aquosa tamponada	-25°C a -15°C
Mistura de poliadenilação	1	DNA polimerase e dATP em solução aquosa tamponada	-25°C a -15°C
Mistura de ligação	1	DNA ligase em solução aquosa tamponada	-25°C a -15°C
Tampão de hibridização	1	Solução aquosa tamponada	-25°C a -15°C
Placa adaptadora de DNA do NIPT	1	Oligonucleotídeos em solução aquosa tamponada	-25°C a -15°C

Tabela 4 Caixa de preparação de bibliotecas do VeriSeq NIPT (96), peça n.º 15066810

Nome do reagente na etiqueta	Número de receptáculos no kit	Ingredientes ativos	Armazenamento
Mistura de reparo de extremidades	1	DNA polimerase e dNTPs em solução aquosa tamponada	-25°C a -15°C
Mistura de poliadenilação	2	DNA polimerase e dATP em solução aquosa tamponada	-25°C a -15°C
Mistura de ligação	2	DNA ligase em solução aquosa tamponada	-25°C a -15°C
Tampão de hibridização	1	Solução aquosa tamponada	-25°C a -15°C
Placa adaptadora de DNA do NIPT	1	Oligonucleotídeos em solução aquosa tamponada	-25°C a -15°C

VeriSeq NIPT Sample Prep Kit, caixa de acessórios

Tabela 5 Caixa de acessórios do VeriSeq NIPT, peça n.º 15066811

Nome do reagente na etiqueta	Número de receptáculos no kit	Ingredientes ativos	Armazenamento
Placa de ligação de DNA	1	Microplaca de propileno com membrana de silicone modificada	2°C a 8°C
Tampão de ressuspensão	1	Solução aquosa tamponada	2°C a 8°C
Beads de purificação de amostras	1	Beads paramagnéticas de fase sólida em solução aquosa tamponada	2°C a 8°C
Reagente de quantificação de DNA	1	Corante intercalante de DNA em DMSO	2°C a 8°C
Padrão de quantificação de DNA	1	Padrão dsDNA, DNA não específico e azida sódica em solução aquosa tamponada	2°C a 8°C

VeriSeq NIPT Sample Prep Kit, tubos e etiquetas de fluxo de trabalho

Tabela 6 Tubos e etiquetas de fluxo de trabalho, peça n.º 15071543

Nome do item na etiqueta	Número de itens no kit	Armazenamento
Etiqueta (LBL) – Código de barras da placa	9	15°C a 30°C
Etiqueta (LBL) – Código de barras da placa de poços profundos	12	15°C a 30°C
Tubo (TB) – Tubo de pooling vazio	5	15°C a 30°C

Reagentes não fornecidos

Reagentes necessários, não fornecidos

- Reagentes e materiais de consumo necessários para sistema de sequenciamento de última geração (NGS)
- Água livre de DNase/RNase certificada – grau biologia molecular
- Etanol, 100% (absoluto) – grau biologia molecular

OBSERVAÇÃO O etanol que não tem grau biologia molecular pode afetar negativamente o desempenho do ensaio.

Reagentes opcionais, não fornecidos

- Solução salina tamponada com fosfato da Dulbecco (DPBS, Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline) para controle sem modelo (NTC, No Template Control)

Armazenamento e manuseio

1. A temperatura ambiente é definida entre 15°C e 30°C.
2. Todos os reagentes devem ser usados apenas uma vez. Depois de preparados para o uso, os reagentes devem ser usados imediatamente.
3. Se algum conteúdo ou embalagem dos componentes do VeriSeq NIPT Solution estiver danificado ou comprometido, entre em contato com o setor de Atendimento ao cliente da Illumina.
4. Os reagentes permanecem estáveis quando armazenados segundo as instruções até a data de vencimento especificada nas etiquetas dos kits. Para obter as condições de armazenamento, consulte a coluna Storage (Armazenamento) nas tabelas da seção [Reagents](#) (Reagentes). Não use reagentes fora da validade.

5. As mudanças na aparência física dos reagentes fornecidos podem indicar deterioração dos materiais. Se ocorrerem mudanças na aparência física (por exemplo, mudanças óbvias na coloração do reagente ou turbidez aparente com contaminação microbiana), não utilize os reagentes.
6. Adote as práticas recomendadas indicadas a seguir ao manusear beads de purificação de amostras:
 - Nunca congele as beads.
 - Aguarde até as beads atingirem a temperatura ambiente antes do uso.
 - Imediatamente antes do uso, agite as beads até que elas fiquem em suspensão e a cor pareça estar homogênea.
7. Tampão de lise, tampão de limpeza I, tampão de limpeza II, tampão de eluição e tampão de proteinase podem formar precipitados ou cristais visíveis. Antes de usar, agite vigorosamente e inspecione visualmente para ter certeza de que não há precipitados presentes.
8. Nunca congele sangue total após a coleta.
9. Faça o sequenciamento das bibliotecas logo depois do pooling. Bibliotecas agrupadas são estáveis por até 7 dias entre -25°C e -15°C. Não será necessária desnaturação adicional se a armazenagem ocorrer nesse período e nessas condições.

Equipamento e materiais

Equipamento e materiais necessários, mas não fornecidos

Equipamento necessário, não fornecido

Equipamento	Fornecedor
Sistema de sequenciamento de última geração (NGS, next-generation sequencing) com os seguintes recursos: <ul style="list-style-type: none"> • Sequenciamento tipo paired-end de 2 x 36 bp • Compatível com adaptadores de índice duplo do VeriSeq NIPT Sample Prep Kit • Produção automática de arquivos BCL • Química de dois canais • 400 milhões de leituras tipo paired-end por execução • Compatível com o VeriSeq NIPT Assay Software v2 ou com um NextSeq 550Dx Sequencing System. 	Fornecedor do instrumento ou Illumina, peça n.º 20005715
Freezer, -25 °C a -15 °C	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório
Microcentrifuga	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório

Equipamento	Fornecedor
Pipetador automático	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório
Refrigerador, 2 °C a 8 °C	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório
Pipetas de canal único de 20 µL	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório
Pipetas de canal único de 200 µL	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório
Pipetas de canal único de 1.000 µL	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório
Agitador	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório
Conjunto de centrífuga e rotor para tubos de coleta de sangue	
Equivalente: <ul style="list-style-type: none"> • Centrífuga refrigerada com capacidade para 1.600 × g com opção no-break • Rotor de caçamba giratória com caçambas • Insertos de caçamba com profundidade mínima de 76 mm • Adaptadores de insertos compatíveis com tubos de coleta de sangue de 16 mm x 100 mm 	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório
Recomendado: <ul style="list-style-type: none"> • Centrífuga Allegra série X12R, 1600 g • Rotor GH-3.8 para Centrífuga Allegra com caçambas • Tampas de caçambas da Centrífuga Allegra, conjunto de duas • Conjunto do adaptador da centrífuga Allegra, 16 mm, conjunto de quatro 	Beckman Coulter, item n.º 392304 (120 V ou 230 V) Beckman Coulter, item n.º 369704 Beckman Coulter, item n.º 392805 Beckman Coulter, item n.º 359150
Conjunto de centrífuga e rotor para microplacas	

Equipamento	Fornecedor
<p>Equivalente:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Centrífuga com capacidade de 5.600 × g • Rotor de placa giratória com suportes para placas de 96 poços, profundidade mínima de 76,5 mm. • Centrífuga Multifuge X4 Pro-MD 120 V TX-1000BT • Centrífuga Sorvall Legend XTR 	<p>Fornecedor de itens de uso comum do laboratório</p> <p>Thermo Fisher Scientific, n.º 75016034 Thermo Fisher Scientific, n.º de catálogo 75004521 (120 V) ou n.º de catálogo 75004520 (230 V)</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Rotor de microplacas HIGHPlate 6000 • Rotor HIGHPlate 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 para placas PCR de 96-poços 	<p>Thermo Fisher Scientific, n.º de catálogo 75003606</p> <p>Thermo Scientific VWR, n.º de catálogo 97040-244</p> <p>Thermo Fisher Scientific, n.º de catálogo 4379590</p> <p>Thermo Fisher Scientific, n.º de catálogo AB-0563/1000</p>
<p>Um dos seguintes leitores de microplacas ou equivalente (fluorímetro) com SoftMax Pro v6.2.2-7.1.2:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Gemini XPS • SpectraMax M2, M3, M4 e M5. <ul style="list-style-type: none"> • Um inserto roxo é necessário para uso do leitor de microplacas no fluxo de trabalho. 	<p>Molecular Devices, peça n.º XPS</p> <p>Molecular Devices, peça n.º M2, M3, M4 e M5</p>
SpectraMax High-Speed USB, adaptador serial	Molecular Devices, peça n.º 9000-0938
<p>Termociclador com as seguintes especificações:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Tampa aquecida • Faixa de temperatura de 4 °C a 98 °C • Precisão de temperatura de ±2 °C • Taxa de aumento mínima de 2 °C por segundo • Compatível com placas PCR de 96-poços Twin.tec de borda inteira 	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório
VeriSeq NIPT Microlab STAR	Hamilton, peça n.º 95475-01 (115 V), peça n.º 95475-02 (230 V) ou peça n.º 806288 (para Hamilton Company Bonaduz)

Equipamento	Fornecedor
VeriSeq Onsite Server v2 ou um VeriSeq Onsite Server com upgrade	Illumina, peça n.º 20028403 ou 20047000 (v2) ou 20101927 ou n.º 15076164 ou n.º 20016240 (com upgrade)
Se estiver usando um NextSeq 550Dx Sequencing System: <ul style="list-style-type: none"> NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5, 75 cycles 	Illumina, peça n.º 20028870

Equipamentos opcionais, não fornecidos

Equipamento	Fornecedor
Pluggo Decapper System	LGP Consulting, peça n.º 4600 4450
Placa de validação de fluorescência SpectraMax SpectraTest FL1	Molecular Devices, peça n.º 0200-5060
Agitador/centrifugador, tubos de 15 mL, 40 rpm, 100 a 240 V	Thermo Scientific, n.º de catálogo 88881001 (EUA) ou n.º de catálogo 88881002 (UE)

Materiais necessários, não fornecidos

Material de consumo	Fornecedor
Pontas de filtro não estéreis condutoras de 1.000 µL	Hamilton, peça n.º 235905
Pontas de filtro não estéreis condutoras de 300 µL	Hamilton, peça n.º 235903
Pontas de filtro não estéreis condutoras de 50 µL	Hamilton, peça n.º 235948
Reservatório de poços profundos com as seguintes especificações: <ul style="list-style-type: none"> Formato de microplaca SLAS 1-2004 com 96 poços de fundo piramidal ou cônico e capacidade mínima de 240 mL. Polipropileno com preferência para baixa ligação de DNA para todas as superfícies de contato com as amostras. As dimensões internas (nível do líquido) são compatíveis com as etapas automatizadas de aspiração e distribuição do VeriSeq NIPT Microlab STAR. As dimensões de altura são compatíveis com os movimentos automatizados do VeriSeq NIPT Microlab STAR. 	<p>Fornecedor de itens de uso comum do laboratório</p> <p>Reservatórios compatíveis:</p> <ul style="list-style-type: none"> Corning Axygen, produto n.º RES-SW96-HP-SI Agilent, produto n.º 201246-100

Material de consumo	Fornecedor
<p>Tubo de reagente com as seguintes especificações:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Tubo que se encaixa firmemente, mas sem forçar, no suporte do VeriSeq NIPT Microlab STAR, com fundo cônico e capacidade mínima de 20 mL. • Polipropileno que seja livre de RNase/DNase. • As dimensões internas do reservatório (nível do líquido) geram níveis de líquido usando volumes de reagentes de ensaio que são compatíveis com as etapas automatizadas de aspiração e distribuição do VeriSeq NIPT Microlab STAR. • As dimensões de altura são compatíveis com os movimentos automatizados do VeriSeq NIPT Microlab STAR. 	<p>Tubos compatíveis:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Tubo de reagente Illumina, peça n.º 20095418
<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 de fundo piramidal ou cônico e capacidade mínima de 2 mL. • Polipropileno transparente com preferência para material de baixa ligação de DNA para todas as superfícies de contato com as amostras. • As dimensões dos poços geram um nível de líquido que é compatível com as etapas automatizadas de aspiração e distribuição do VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Borda de placa que permite a colocação de códigos de barra de placas na posição necessária com adesão firme em superfície plana. • Estrutura resistente ao torque capaz de sustentar um mínimo de 5.600 × g. • As dimensões de altura das placas são compatíveis com os movimentos automatizados do VeriSeq NIPT Microlab STAR 	<p>Fornecedor de itens de uso comum do laboratório</p> <p>Placas compatíveis:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Eppendorf, peça n.º 0030505301 • Eppendorf, peça n.º 30502302 • USA Scientific, peça n.º 1896-2000

Material de consumo	Fornecedor
<p>Placa de 384 poços com as seguintes especificações:</p> <ul style="list-style-type: none">• Microplaca de 384 poços, otimizada para baixos volumes, com capacidade mínima dos poços de 50 µL.• Poliestireno opaco com proteção contra luz e com baixa ligação de DNA para todas as superfícies de contato com as amostras.• As dimensões dos poços geram níveis de líquido que são compatíveis com as etapas automatizadas de aspiração e distribuição do VeriSeq NIPT Microlab STAR.• As dimensões de altura das placas são compatíveis com os movimentos automatizados do VeriSeq NIPT Microlab STAR.• Borda de placa que permite a colocação de códigos de barra de placas na posição necessária com adesão firme em superfície plana.	<p>Fornecedor de itens de uso comum do laboratório</p> <p>Placas compatíveis:</p> <ul style="list-style-type: none">• Corning, produto n.º 3820

Material de consumo	Fornecedor
<p>Placa de 96 poços com as seguintes especificações:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Microplaca com estrutura resistente ao torque capaz de sustentar um mínimo de 5.600 × g e 96 poços transparentes com fundos cônicos, bordas elevadas e capacidade mínima de 150 µL. • Polipropileno que seja livre de RNase/DNase com baixa ligação de DNA para todas as superfícies de contato com as amostras. • As dimensões dos poços geram níveis de líquido que são compatíveis com as etapas automatizadas de aspiração e distribuição do VeriSeq NIPT Microlab STAR. • As dimensões de altura das placas são compatíveis com os movimentos automatizados do VeriSeq NIPT Microlab STAR. <p>OBSERVAÇÃO: Plásticos compatíveis com números de peças diferentes, por exemplo, placas de 96 poços compatíveis de fabricantes diferentes, podem não ser diretamente intercambiáveis sem a calibração específica da peça do sistema VeriSeq NIPT Microlab STAR pela equipe de serviço e suporte da Illumina. Para alterar os materiais plásticos, consulte a equipe de suporte da Illumina.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Borda de placa que permite a colocação de códigos de barra de placas na posição necessária com adesão firme em superfície plana. • Compatível com termocicladores para desnaturação. 	<p>Fornecedor de itens de uso comum do laboratório</p> <p>Placas compatíveis:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Eppendorf, peça n.º 0030129512 • Eppendorf, peça n.º 30129580 • Eppendorf, peça n.º 30129598 • Eppendorf, peça n.º 30129660 • Eppendorf, peça n.º 30129679 • Bio-Rad, peça n.º HSP9601
<p>Um dos seguintes selos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Microselo "F" de alumínio • Selos de alumínio 	<p>Bio-Rad, n.º de catálogo MSF1001 Beckman Coulter, item n.º 538619</p>
Cell-Free DNA BCT CE	Streck, n.º de catálogo 218997
Tampas de pressão	Sarstedt, pedido n.º 65.802
Tubos com tampa de rosca, 2 mL	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório
Pontas de filtro de 20 µL para pipetador de 20 µL	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório
Pontas de filtro de 200 µL para pipetador de 200 µL	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório

Material de consumo	Fornecedor
Pontas de filtro de 1000 µL para pipetador de 1000 µL	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório
Equivalente: <ul style="list-style-type: none"> Spray desinfetante rápido à base de álcool Solução de detergente desinfetante Recomendado: <ul style="list-style-type: none"> Água deionizada e etanol 70% 	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório

Materiais opcionais, não fornecidos

Material de consumo	Fornecedor
Solução salina tamponada com fosfato da Dulbecco (DPBS, Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline) para controle sem modelo (NTC, No Template Control)	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório
Tubo, tampa de rosca, 10 mL (somente para amostras de controle)	Sarstedt, pedido n.º 60.551
Tubo, tampa de rosca, 50 mL	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório
Pipetas sorológicas de 25 mL	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório
Pipetas sorológicas de 10 mL	Fornecedor de itens de uso comum do laboratório

Coleta, transporte e armazenamento da amostra



CUIDADO

Manuseie todas as amostras como se elas fossem potencialmente agentes infecciosos.

- Devem ser coletadas amostras de sangue total de 7–10 mL em um tubo de coleta de sangue (BCT) de DNA livre de células Streck. Não congele.
- O transporte de sangue total deve cumprir os regulamentos aplicáveis que regem o transporte de agentes etiológicos. São recomendados métodos rápidos de envio/transporte.
- Durante o transporte, armazene entre 4°C e 30°C. Após o recebimento das amostras, armazene entre 2°C e 8°C até o início do procedimento. O tempo decorrido entre a coleta de sangue e o isolamento de plasma inicial não deve ultrapassar 5 dias.
- Caso seja necessário repetir um teste, as amostras pós-processamento podem ser novamente tampadas e armazenadas a 4°C por mais 5 dias (até um total de 10 dias após a coleta de sangue).



CUIDADO

A exposição a temperaturas elevadas acima dos intervalos mencionados pode afetar negativamente os índices de falha de amostras individuais e/ou o desempenho da amostra.

Advertências e precauções

- Este ensaio contém proteinase K. Podem ocorrer lesões por inalação, ingestão e contato com a pele ou com os olhos. Use em uma área bem ventilada, use roupa protetora, evite aspirar a poeira e descarte todos os recipientes e o conteúdo não utilizado, de acordo com as normas de segurança governamentais.
- Este ensaio contém cloreto de guanidina. Podem ocorrer lesões por inalação, ingestão e contato com a pele ou com os olhos. Use em uma área bem ventilada, use roupa protetora e descarte todos os recipientes e o conteúdo não utilizado, de acordo com as normas de segurança governamentais locais.
- Este ensaio contém álcool isopropílico, que é um agente químico inflamável. Mantenha-o longe de fontes de calor e de chamas. Podem ocorrer lesões por inalação, ingestão e contato com a pele ou com os olhos. Use em uma área bem ventilada, use roupa protetora e descarte todos os recipientes e o conteúdo não utilizado, de acordo com as normas de segurança governamentais locais.
- Este ensaio contém dimetilsulfóxido, líquido corrosivo e combustível. Podem ocorrer lesões por inalação, ingestão e contato com a pele ou com os olhos. Use em uma área bem ventilada, use roupa protetora e descarte todos os recipientes e o conteúdo não utilizado, de acordo com as normas de segurança governamentais locais.
- Para evitar a formação de gases nocivos, não descarte o resíduo da extração de cfDNA (contém tiocianato de guanidina) com resíduos que contenham alvejante (hipoclorito de sódio).
- Manuseie todas as amostras como se elas contivessem agentes potencialmente infecciosos.
- Adote precauções de rotina do laboratório. Não utilize a pipeta com a boca. Não coma, beba ou fume em áreas de trabalho designadas. Use luvas descartáveis e jalecos ao manusear amostras e reagentes de ensaio. Lave as mãos cuidadosamente após manusear amostras e reagentes de ensaio.
- Não use nenhum componente de ensaio fora do prazo de validade indicado na etiqueta da caixa do ensaio. Não intercambie componentes de ensaio de diferentes lotes. Os lotes de ensaio são identificados na etiqueta da caixa do ensaio. Armazene os componentes de ensaio na temperatura especificada.
- Para evitar a degradação de amostras ou reagentes, certifique-se de que todos os vapores de hipoclorito de sódio da limpeza tenham se dissipado por completo antes de iniciar o protocolo.
- Se os procedimentos não forem seguidos conforme o estabelecido, poderá haver resultados com erro ou uma redução significativa na qualidade da amostra.
- Imediatamente informe à Illumina e às autoridades competentes dos estados membros em que o usuário e o paciente estiverem estabelecidos quaisquer incidentes graves relacionados a este produto.
- Para obter informações sobre ambiente, saúde e segurança, consulte as fichas de dados de segurança (SDS) em support.illumina.com/sds.html.

Observações sobre o procedimento

Para evitar contaminação

- Use pontas e materiais de consumo novos.
- Use pontas resistentes a aerossóis para reduzir o risco de carryover e de contaminação cruzada das amostras.
- Devido ao potencial de contaminação, tome muito cuidado para que o conteúdo permaneça por completo dentro do poço. Não derrame o conteúdo. Centrifugue após cada etapa de agitação.
- Siga os regulamentos aplicáveis que regem as práticas laboratoriais e de higiene adequadas ao manusear sangue e derivados do sangue.
- Não use sprays com alvejantes durante a preparação das bibliotecas. A contaminação residual pelo alvejante pode ocasionar falha no ensaio.
- Ao remover a vedação de uma placa, tome cuidado para colocá-la sobre uma superfície firme e plana, segurando-a com firmeza. Remova lentamente a vedação, garantindo que ela não entre em contato com os poços expostos. Tome cuidado para não tocar nos poços expostos nem agitar o conteúdo. Uma contaminação cruzada poço a poço pode produzir resultados incorretos.

Limpeza da plataforma do VeriSeq NIPT Microlab STAR

- Antes de usar, inspecione a limpeza da plataforma. Pelo menos uma vez por semana, faça a manutenção e siga estas instruções de limpeza.
- Remova todos os suportes descarregáveis e limpe com um spray desinfetante rápido à base de álcool, água deionizada e etanol a 70% e aguarde secar. Se estiverem muito sujos, mergulhe-os depois em uma solução com detergente desinfetante, enxágue com o desinfetante à base de álcool e deixe secar.
- Abra a tampa frontal e limpe a plataforma com um pano saturado com água deionizada e etanol a 70%. Verifique se os blocos laterais, particularmente, estão limpos.
- Remova e limpe o coletor do sistema básico de vácuo (BVS), a junta e os compartimentos inferiores do BVS com um pano. Evite limpar a junta com etanol, pois o material pode se tornar quebradiço.
- 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: use água deionizada e etanol a 70% diretamente na superfície e limpe. Coloque um novo saco plástico sobre a estrutura e volte a fixá-la. Volte a colocar a placa de ejeção de pontas limpa no lugar.
- Borrife água deionizada e etanol a 70% diretamente na superfície do recipiente de resíduos de pontas da cabeça CORE de 96 pipetas e limpe-a.

- Se for difícil remover o acúmulo de resíduos nas pontas, limpe com um pano embebido em água livre de RNase/DNase até que o acúmulo seja removido. Descarte o pano adequadamente. Esterilize com o desinfetante à base de álcool.
- Umedeça um pano sem fiapos ou uma compressa de algodão com etanol a 70%. Limpe a janela do scanner a laser do leitor de código de barras. Usando o mesmo pano ou compressa, limpe cada poço do adaptador de placas do CPAC. Se for usado 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 fique 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 fiapos embebido em água deionizada e etanol a 70%. (Consulte o *Guia de referência Hamilton do Microlab STAR n.º 15070074.*)
 - Limpe o disco de frenagem e os anéis de retenção da cabeça de pipetagem (parte exterior dos canais de pipetagem) com um pano sem fiapos embebido em água deionizada e etanol a 70%.
- Limpe a cabeça do CORE de 96 pipetas:
 - Usando o mesmo pano sem fiapos embebido em água deionizada e etanol a 70%, limpe o revestimento da cabeça de 96 pipetas e a parte inferior dos discos de frenagem.
 - Usando o mesmo pano ou uma tira de pano torcida embebida em água deionizada e etanol a 70%, limpe em torno das partes laterais dos canais de pipetagem da cabeça de 96 pipetas para limpar os anéis de retenção. Repita esse procedimento para todos os canais de pipetagem da cabeça de 96 pipetas.
- Borrife a tampa frontal e lateral com água deionizada e etanol a 70% e seque com um pano.
- Limpe a fita protetora de carregamento automático com um pano embebido em água deionizada e etanol a 70% e limpe sem exercer pressão.
- Quando a plataforma e os componentes estiverem completamente secos, recoloque os suportes.

OBSERVAÇÃO A manutenção e a limpeza incorretas do ML STAR podem causar contaminação cruzada e desempenho inadequado do ensaio.

Controle de qualidade

O material de controle com características conhecidas de desempenho pode ser avaliado para a detecção de diferenças no processamento e nos procedimentos técnicos no laboratório.

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

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

Instruções de uso

Dicas e técnicas

A menos que um ponto de interrupção segura esteja especificado no protocolo, prossiga imediatamente para a etapa seguinte.

Placas com código de barras

- Os códigos de barra para placas de borda inteira começam com PL.
- Os códigos de barra para placas de poços profundos começam com DW.
- Aplique códigos de barras em placas de borda inteira e em placas de poços profundos no lado adjacente à coluna 12.
- Carregue as placas com o código de barras virado para a direita para permitir a leitura automática.

Aplicação e remoção do selo da placa

- Tome muito cuidado para evitar contaminação cruzada: não deve haver nenhum líquido visível na parte inferior da vedação.
 - A parte inferior exposta da vedação não deve entrar em contato com os poços expostos.
 - Tome cuidado para não tocar os poços expostos.
- Sempre vede a placa de 96 poços antes das seguintes etapas do protocolo:
 - Etapas de centrifugação
 - Etapas de ciclos térmicos
- Para vedar a placa, aplique o selo de alumínio à placa e vede. Aplique pressão em toda a placa. A vedação deve estar firme em cada poço individual.
- Antes de retirar a vedação da placa, faça o seguinte:
 - Centrifugue ligeiramente a placa de 96 poços a 1000 × g por 20 segundos.
 - Coloque a placa em uma superfície plana antes de retirar lentamente a vedação.

VeriSeq NIPT Microlab STAR

- Antes de usar, realize e documente a manutenção necessária de acordo com as instruções do fabricante.
- Observe o ML STAR durante as etapas automáticas. Monitore os avisos e as instruções do operador na interface do software do Gerenciador de fluxo de trabalho do VeriSeq NIPT v2.
- Mantenha a tampa frontal no lugar durante a operação.
- Retire todos os itens da plataforma durante a operação.
- Se aparecer um botão com a opção **Exclude** (Excluir) durante um evento de tratamento de erros, evite escolher essa opção em todas as circunstâncias. Se o método não puder prosseguir ou tiver opções limitadas de tratamento de erros, interrompa a execução.

- Durante as etapas do sistema de vácuo na placa, caso solicitado pelo Gerenciador de fluxo de trabalho do VeriSeq NIPT v2, ajude manualmente a formar a vedação entre a placa e o coletor de vácuo.
- Deixe o sistema descartar as pontas do adaptador automaticamente. Não retire as pontas manualmente a menos que solicitado pelo software.
- Retire os reagentes e os materiais de consumo usados ao ser solicitado pelo Gerenciador de fluxo de trabalho.
- Esvazie os recipientes de resíduos de vácuo diariamente. O primeiro recipiente nunca deve ficar mais cheio que a metade. O excesso de resíduos pode danificar a bomba de vácuo e reduzir o vácuo aplicado do sistema.
- Para lotes de 24, 48 e 96 amostras, carregue um rack completo de pontas de 8 canais contadas individualmente antes de iniciar o método.

Processar amostras

Procedimento

1. Conclua as seguintes etapas para cada alíquota:
 - a. Centrifugue as amostras com código de barras a 1600 × g por 10 minutos a 4°C com o freio desativado.
 - b. Quando a centrífuga parar por completo, remova os tubos de amostras.
Após a centrifugação, inicie o isolamento de plasma em até 15 minutos. Se decorrerem mais de 15 minutos, centrifugue novamente.
2. Inspeção cada tubo quanto à adequação da amostra, incluindo a verificação do seguinte:
 - O volume da amostra é o esperado.
 - Está visível uma separação clara entre as hemácias e as camadas de plasma nas amostras após a centrifugação.
 - O nível do plasma está pelo menos 1,5 mL acima da camada leucoplaquetária.
 - A amostra não está excessivamente hemolisada (ou seja, o plasma não tem aparência excessivamente vermelha).
 - A amostra não está lipêmica (ou seja, o plasma não tem aparência branca turva ou leitosa opaca).
 - A amostra não apresenta coágulos.



CUIDADO

Amostras que foram imprópriamente armazenadas ou manuseadas podem se tornar inadequadas. Se amostras inadequadas forem processadas ao longo do fluxo de trabalho, elas poderão obstruir a placa de ligação durante as extrações, causando eventos de transbordamento das amostras para os poços adjacentes.

3. Destampe os tubos e coloque-os nos suportes. Carregue todas as amostras e os controles de plasma para o lote.

**CUIDADO**

Durante um evento de tratamento de erros, se for apresentada a opção Exclui (Excluir), não a selecione. Se o método não puder prosseguir e você tiver opções limitadas de tratamento de erros, interrompa a execução.

Isolar plasma

Preparação

1. Etiquete 1 placa de poços profundos como Plasma intermediário e aplique um código de barras.
2. Etiquete 1 placa de poços profundos como Plasma final e aplique um código de barras.
3. Para lotes de 24, 48 e 96 amostras, carregue um rack completo de pontas de 8 canais contadas individualmente antes de iniciar o método.

**CUIDADO**

Certifique-se de usar o tipo correto de placa para plasma intermediário e plasma final. O uso de um reservatório de poços profundos em vez de uma placa de poços profundos causa mistura das amostras e pode produzir resultados incorretos.

Procedimento

1. Abra o AppLauncher e selecione **VeriSeq NIPT Method** (Método VeriSeq NIPT).
2. Insira um ID de lote exclusivo e o nome do usuário e selecione **OK**.
O ID do lote pode conter ≤26 caracteres. Use números, letras, sublinhados (_) ou traços (-). Por exemplo: 2025-10-16_Lote3.
O código de barras da amostra não diferencia maiúsculas de minúsculas. Códigos de barra que diferenciam maiúsculas de minúsculas não são considerados exclusivos.
O nome dos lotes deve ser exclusivo e não deve ser diferenciado somente por letras maiúsculas/minúsculas. Por exemplo, os nomes Lote01 e lote01 não são exclusivos. A mesma regra aplica-se à nomenclatura do ID de amostras.
3. Selecione **New Batch** (Novo lote).
4. Após o início, selecione **OK** para iniciar o isolamento de plasma.
5. Selecione o tamanho do lote e selecione **OK**.
6. Selecione o número de controles sem modelo (NTCs) e selecione **OK**.
Os slots de NTC sempre são os últimos slots selecionados. Por exemplo, com dois NTCs em uma execução de 24 amostras, as posições 23 e 24 são NTCs.
7. Execute uma das seguintes etapas:
 - Para carregar uma planilha de amostras existente, selecione a planilha de amostras associada ao lote e selecione **OK**.

- Para avançar sem selecionar uma planilha de amostras, selecione **No Sample Sheet** (Nenhuma planilha de amostras).

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

OBSERVAÇÃO O tipo de amostra, gestação única ou gemelar, deve ser registrado com precisão para cada amostra para garantir a análise adequada dos dados. Antes de selecionar a opção **No Sample Sheet** (Nenhuma planilha de amostras), defina valores padrão nas ferramentas de serviço do Gerenciador do fluxo de trabalho. Para obter mais informações, consulte o *Guia do software VeriSeq NIPT Solution v2 (documento n.º 1000000067940)*.

- Certifique-se de que todos os códigos de barra estejam no lugar e carregue as amostras, pontas e placas (código de barras virado para a direita) no suporte.
- Selecione **OK** depois de cada solicitação de carga.

Tamanho do lote de amostras	Suporte Tipo	Trilha	Item	Posição no local
24, 48, 96	Ponta	7–12	Pontas de 1000 µL	5
			Pontas de 1000 µL (somente lotes com 96)	4, 5
	Tubo	15	Tubos de amostras de sangue preparados 1–24 (para lotes de todos os tamanhos)	1–24
	Tubo	16	Tubos de amostras de sangue preparados 25–48 (somente lotes com 48 e 96)	25–48
	Tubo	17	Tubos de amostras de sangue preparados 49–72 (somente lote com 96)	49–72
	Tubo	18	Tubos de amostras de sangue preparados 73–96 (somente lote com 96)	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 intermediário – com código de barras	5
	Reagente	47	[Opcional] Solução salina tamponada com fosfato da Dulbecco (DPBS, Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline) para controle sem modelo (NTC, No Template Control)	5

- Certifique-se de que os suportes, os materiais de laboratório e os reagentes sejam carregados corretamente.
- Na tela Pre-Spin Deck Verification (Verificação da plataforma de pré-rotação), selecione **OK**.

12. Observe o ML STAR executar as etapas automáticas.
13. Quando solicitado pelo Gerenciador de fluxo de trabalho, certifique-se de que a plataforma de carregamento do ML STAR esteja 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 intermediário como segue.
 - a. Inspeção a placa para verificar a consistência dos volumes em cada poço (sem erros de pipetagem). O volume esperado é 1000 µL.
 - b. Registre as inconsistências quando o procedimento de isolamento do plasma estiver concluído.
 - c. Vede a placa, carregue-a de forma equilibrada e centrifugue a 5600 × g por 10 minutos com o freio desativado ou na configuração mais baixa.
16. Selecione **Yes** (Sim) para ir para a preparação do plasma final.
17. Remova a vedação da placa e recarregue a placa no suporte.

Tamanho do lote de amostras	Suporte Tipo	Trilha	Item	Posição no local
24, 48, 96	Multiflex	19–24	Placa de poços profundos de plasma intermediário	5

18. Marque a caixa de seleção **Intermediate Plasma plate has been spun** (A placa de plasma intermediário foi girada) e selecione **OK**.
19. Observe o ML STAR executar as etapas automáticas.
20. Quando solicitado pelo Gerenciador de fluxo de trabalho, certifique-se de que a plataforma de carregamento do ML STAR esteja livre de obstruções para permitir que o ML STAR descarregue os suportes.
21. Selecione **Unload** (Descarregar) para descarregar a plataforma.
22. Quando solicitado pelo Gerenciador de fluxo de trabalho, esvazie os suportes e a plataforma.
23. Remova a placa de poços profundos de Plasma final.
24. Inspeção a placa em busca dos seguintes erros:
 - Volumes inconsistentes em cada poço. O volume esperado é 900 µL.
 - Sedimentos celulares visíveis.
 - Hemólise excessiva.

Se houver sedimentos celulares anormais ou hemólise em excesso visível, invalide a amostra afetada no final do método de isolamento de plasma ou use o Gerenciador de lote. Para obter mais informações sobre o Gerenciador de lote, consulte o *Guia do software VeriSeq NIPT Solution v2 (documento n.º 1000000067940)*.
25. Quando solicitado pelo Gerenciador de fluxo de trabalho, selecione **OK**.
26. Insira comentários sobre os poços afetados e selecione **OK**.

27. Execute uma das seguintes etapas.

- Para prosseguir para a extração de cfDNA, selecione **Yes** (Sim).
- Para parar, selecione **Exit** (Sair).

PONTO DE INTERRUPÇÃO SEGURA

Se for interromper o procedimento, vede a placa de plasma final e armazene entre 2°C e 8°C por no máximo 7 dias.

Extrair cfDNA

Preparação

1. Faça uma inspeção visual nas caixas de extração e acessórias para confirmar que o kit está dentro da validade.
2. Prepare os reagentes a seguir. Etiquete os tubos dos reservatórios e os 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 tiver sido armazenada anteriormente, deixe repousar durante 30 minutos para atingir a temperatura ambiente. Centrifugue a 1.000 × g por 20 segundos. Retire a vedação da placa de poços profundos de plasma final antes de usar.

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. Tampe os frascos de proteinase K e agite até a ressuspensão.



CUIDADO

Não contamine a rolha de borracha. O contato da rolha de borracha com outras substâncias poderá contaminar futuras amostras.

5. Junte a proteinase K preparada de todos os frascos em um tubo de reagente e identifique-o como Proteinase K.
6. Adicione 100 mL de EtOH a 100% a cada frasco de reagente de tampão de limpeza II.
 - Prepare um frasco para 24 e 48 amostras.
 - Prepare dois frascos para 96 amostras.
7. Inverta os frascos de tampão de limpeza II para misturar.
8. Marque as caixas de seleção nos frascos de solução tampão de limpeza II.

9. Etiquete uma nova placa de borda inteira como Intermediária e aplique um código de barras.
10. Etiquete uma nova placa de borda inteira como Eluição de cfDNA e aplique um código de barras.
11. Etiquete uma nova placa de poços profundos como Extração intermediária e aplique um código de barras.
12. Aplique um código de barras à placa de ligação de DNA.
13. Aplique um selo de alumínio aos poços não vedados para lotes de 24 e 48 amostras.
14. Prepare uma solução de limpeza com EtOH a 70% (EtOH a 70%, 30% de água livre de RNase/DNase) para a limpeza do sistema de vácuo.
15. Prepare o sistema de vácuo da forma a seguir.
 - a. Remova o coletor de vácuo e limpe com EtOH a 70%.
Evite limpar a junta com EtOH, pois isso pode tornar o material quebradiço.
 - b. Esvazie o recipiente de resíduos de vácuo.
 - c. Certifique-se de que o sistema de vácuo do ML STAR esteja ligado.

Procedimento

1. Selecione **OK** para iniciar a extração de cfDNA.
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. Insira o ID do lote e o nome do usuário e selecione **OK**.
3. Carregue as pontas nos suportes das pontas conforme indicado a seguir e selecione **OK**.



CUIDADO

Antes de iniciar o método para lotes de 24, 48 e 96 amostras, adicione um rack completo de pontas de 8 canais.

Tamanho do lote de amostras	Tipo de suporte	Trilha	Item	Posição no 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. Carregue as pontas contadas nos suportes das pontas conforme indicado a seguir.

Tamanho do lote de amostras	Tipo de suporte	Trilha	Item	Posição no local
24, 48, 96	Ponta	49–54	Pontas de 1000 µL	1
			Pontas de 300 µL	2
			Pontas de 50 µL	3

- Insira o local da primeira e da última ponta para cada rack de pontas e selecione **OK**.
- Faça a leitura dos códigos de barra da caixa de extração.
- Insira o nome do usuário ou as iniciais do preparador do reagente e selecione **OK**.
- Faça a leitura dos códigos de barra da caixa de acessórios.
- Insira o nome do usuário ou as iniciais do preparador do reagente e selecione **OK**.
- Certifique-se de que os códigos de barra estejam fixados.
- Retire o selo da placa de poços profundos de Plasma final, se necessário.
- Carregue as placas (com o código de barras virado para a direita) no suporte da placa conforme indicado a seguir e selecione **OK**.

Tamanho do lote de amostras	Tipo de suporte	Trilha	Item	Posição no local
24, 48, 96	Multiflex	19–24	Nova placa de borda inteira, intermediária, com código de barras	1
			Nova placa de borda inteira, eluição de cfDNA, com código de barras	2
			Nova placa de poços profundos, extração intermediária, com código de barras	4
			Placa de poços profundos de Plasma final, com código de barras	5

- Certifique-se de que a placa de ligação de DNA tenha código de barras e selecione **OK**.
- Para lotes parciais de placas, aplique uma vedação cortada ao longo dos poços não usados (colunas 4-12 para lotes de 24 amostras e colunas 7-12 para lotes de 48 amostras).
- Carregue a placa de ligação de DNA no coletor de vácuo com o código de barras virado para a direita.
- Antes de colocar a placa de ligação no coletor BVS, inspecione visualmente os poços em busca de possíveis obstruções.
Isso pode impedir o fluxo de reagentes sob vácuo.

17. Ao utilizar lotes de 24 ou 48 amostras, cubra os poços não utilizados e vede com selo de alumínio. Marque a caixa de seleção **Are DNA Binding Plate Columns Sealed?** (As colunas da placa de ligação de DNA estão vedadas?) e selecione **OK**.

18. Carregue os tubos de reagentes no suporte de reagentes como mostrado a seguir e selecione **OK**.

Tamanho do lote de amostras	Tipo de suporte	Trilha	Item	Posição no 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 de poços profundos e carregue os reservatórios nos suportes de poços profundos, como segue.

20. Selecione **OK**.

Tamanho do lote de amostras	Tipo de suporte	Trilha	Item	Posição no local
24, 48	Poço profundo	39–44	125 mL de tampão de limpeza II	1
			125 mL de tampão de limpeza I	2
			60 mL de EtOH 100%	3
			100 mL de tampão de lise	4
			60 mL de água livre de RNase/DNase	5
96	Poço profundo	39–44	200 mL de tampão de limpeza II	1
			125 mL de tampão de limpeza I	2
			100 mL de EtOH 100%	3
			100 mL de tampão de lise	4
			100 mL de água livre de RNase/DNase	5

21. Aguarde a conclusão da verificação automática do volume de reagente.

22. Confirme se o recipiente de resíduos de vácuo está vazio (recomenda-se que esteja pela metade) e selecione **OK**.

23. Confirme a colocação de todos os suportes, materiais de laboratório e reagentes e selecione **OK** na tela Extraction Deck Verification (Verificação da plataforma de extração).

24. Observe o ML STAR durante as etapas automáticas.

**CUIDADO**

Invalide manualmente os transbordamentos de amostras não detectados pelo sistema antes da contaminação dos poços adjacentes\

25. Após a última etapa de vácuo, remova a placa de ligação de DNA e limpe a superfície inferior com EtOH 70%.
26. Vede os poços descobertos da placa de ligação de DNA e coloque-a na placa de poços profundos de plasma final vazia.
27. Centrifugue o conjunto placa de ligação de DNA/placa de plasma final a 5600 × g por 10 minutos com o freio ativado.
28. Selecione **OK**.
29. Durante a centrifugação da placa de ligação de DNA, conclua a limpeza do vácuo:
 - a. Remova o coletor de vácuo e selecione **OK**.
 - b. Aguarde a conclusão do descarte automático de resíduos.
 - c. Limpe o coletor de vácuo e o interior do sistema de vácuo com etanol 70% e recoloque o coletor de vácuo.
 - d. Marque a caixa de seleção **Manifold is on Vacuum** (O coletor está em vácuo) para iniciar a transferência da placa de eluição no coletor de vácuo e selecione **OK**.
30. Após a centrifugação, retire a vedação dos poços que contêm as amostras da placa de ligação de DNA.
31. Coloque-a na parte superior da placa de eluição de cfDNA que está no coletor de vácuo.
32. Carregue a placa de ligação de DNA com o código de barras virado para a direita e selecione **OK**.
33. Observe o ML STAR durante as etapas automáticas.
34. Após a etapa de incubação, marque a caixa de seleção **Plates are assembled as indicated** (As placas estão montadas conforme indicado). Confirme se o conjunto da placa de eluição de cfDNA/ligação de DNA está em uma base do suporte (se exigido pela centrífuga).
35. Vede os poços descobertos da placa de ligação de DNA.
36. Centrifugue a 5600 × g por 2 minutos com o freio ativado e selecione **OK**.
37. Inspeção visualmente a placa de eluição de cfDNA para verificar a consistência dos volumes em cada poço.

O volume esperado é de aproximadamente 55 µL.
38. Vede e retenha a placa de eluição de cfDNA para a preparação da biblioteca.
39. Quando solicitado pelo Gerenciador de fluxo de trabalho, certifique-se de que a plataforma de carregamento do ML STAR esteja livre de obstruções para permitir que o ML STAR descarregue os suportes.
40. Selecione **Unload** (Descarregar) para descarregar a plataforma.
41. Descarregue todos os suportes, limpe a plataforma do ML STAR e selecione **OK**.
42. Insira comentários sobre os poços afetados e selecione **OK**.

43. Execute uma das seguintes etapas:

- Para continuar a preparar bibliotecas, selecione **Yes** (Sim).
- Para parar, selecione **Exit** (Sair).

PONTO DE INTERRUPÇÃO SEGURA

Se for interromper o procedimento, vede a placa de eluição de cfDNA e armazene entre -25°C e -15°C por no máximo 7 dias.

Preparar bibliotecas

Preparação

1. Faça uma inspeção visual nas caixas de acessórios e de preparação de bibliotecas para confirmar que os kits estão dentro da validade.
2. Prepare os seguintes reagentes. Etiquete os tubos do reservatório e os reservatórios de poços profundos com os nomes dos reagentes.

Reagente	Armazenamento	Instruções
Mistura de poliadenilação	-25°C a -15°C	Descongele em temperatura ambiente. Agite para misturar e centrifugue ligeiramente.
Placa de eluição de cfDNA	-25°C a -15°C	Se tiver sido anteriormente armazenada, verifique se a placa não foi armazenada por mais de 7 dias e descongele em temperatura ambiente. Agite a 1500 rpm por 1 minuto. Centrifugue a 1000 × g por 20 segundos.
Mistura de reparo de extremidades	-25°C a -15°C	Descongele em temperatura ambiente. Agite para misturar.
Tampão de hibridização	-25°C a -15°C	Descongele em temperatura ambiente. Agite para misturar. Volte a armazenar após o uso.
Mistura de ligação	-25°C a -15°C	Descongele em temperatura ambiente. Agite para misturar e centrifugue ligeiramente.
Placa adaptadora de DNA do NIPT	-25°C a -15°C	Descongele em temperatura ambiente. Agite para misturar. Centrifugue a 1000 × g por 20 segundos.
Tampão de ressuspensão	2°C a 8°C	Agite para misturar. Volte a armazenar após o uso.
Beads de purificação de amostras	2°C a 8°C	Deixe repousar durante 30 minutos para atingir a temperatura ambiente. Agite vigorosamente antes de cada uso. Misture por agitação ou inversão até que todas as beads estejam em suspensão e a mistura esteja homogênea.

**CUIDADO**

Ao retirar a vedação da placa adaptadora de DNA do NIPT, tome muito cuidado para evitar contaminação cruzada por aerossol entre os poços, 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 em temperatura ambiente.
 - b. Agite a 1500 rpm por 1 minuto.
 - c. Centrifugue a 1000 × g por 20 segundos.
4. Etiquete uma nova placa de borda inteira como Bibliotecas e aplique um código de barras.
5. Prepare etanol a 80% a partir de etanol absoluto. Combine 40 mL de etanol a 100% e 10 mL de água livre de RNase/DNase. Inverta para misturar.
6. Certifique-se de que o controle térmico do ML STAR esteja ligado.

Diluir enzimas

1. Combine a mistura de poliadenilação (A-Tailing) e a solução tampão de ressuspensão em um tubo com tampa de rosca. Agite para misturar e centrifugue ligeiramente.

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

2. Combine a mistura de ligação e a solução tampão de ressuspensão em um tubo com tampa de rosca. Agite para misturar e centrifugue ligeiramente.

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

Procedimento

1. Selecione **OK** para iniciar a preparação da biblioteca. Se o **Método VeriSeq NIPT** ainda não estiver aberto:
 - a. Abra o AppLauncher e selecione **VeriSeq NIPT Method** (Método VeriSeq NIPT).
 - b. Insira o ID do lote e o nome do usuário e selecione **OK**.
2. Confirme se os seguintes materiais de consumo estão preparados conforme indicado na tela Reagent Preparation (Preparação do reagente):
 - Mistura de poliadenilação, mistura de ligação e etanol a 80%.
 - Beads de purificação de amostras, mistura de reparo de extremidades e a placa adaptadora de DNA do VeriSeq NIPT.
3. Marque as caixas de seleção e selecione **OK**.

4. Leia os códigos de barras da Caixa de preparação de bibliotecas.
5. Insira o nome do usuário ou as iniciais do preparador do reagente e selecione **OK**.
6. Faça a leitura dos códigos de barra da caixa de acessórios.
7. Insira o nome do usuário ou as iniciais do preparador do reagente e selecione **OK**.
8. Carregue as pontas nos suportes das pontas conforme indicado a seguir e selecione **OK** para cada suporte.

Tamanho do lote de amostras	Tipo de suporte	Trilha	Item	Posição no local
24	Ponta	1 a 6	Pontas de 50 µL	1
		7 a 12	Pontas de 300 µL	1, 2
48	Ponta	1 a 6	Pontas de 50 µL	1, 2
		7 a 12	Pontas de 300 µL	1, 2, 3, 4
96	Ponta	1 a 6	Pontas de 50 µL	1, 2, 3, 4
		7 a 12	Pontas de 300 µL	1, 2, 3, 4, 5

9. Se você tiver interrompido o protocolo após o procedimento de extração de cfDNA, carregue as pontas contadas nos suportes das pontas conforme indicado a seguir.

Tamanho do lote de amostras	Tipo de suporte	Trilha	Item	Posição no local
24, 48, 96	Ponta	49 a 54	Pontas de 1.000 µL	1
			Pontas de 300 µL	2
			Pontas de 50 µL	3

10. Insira o local da primeira ponta para cada rack de pontas e selecione **OK**.
11. Confirme se os códigos de barra estão afixados, carregue as placas (com o código de barras virado para a direita) no suporte das placas como mostrado a seguir e selecione **OK**.

Tamanho do lote de amostras	Tipo de suporte	Trilha	Item	Posição no local
24, 48, 96	Multiflex	19 a 24	Placa de eluição de cfDNA – com código de barras	1
			Placa adaptadora de DNA do NIPT – com código de barras	2
			Nova placa de borda inteira de 96 poços, bibliotecas – com código de barras	3
			Novas placas de borda inteira de 96 poços	4, 5

12. Carregue o suporte de poços profundos como mostrado a seguir e selecione **OK**.

Tamanho do lote de amostras	Tipo de suporte	Trilha	Item	Posição no local
24, 48, 96	Poço profundo	39 a 44	50 mL de EtOH a 80% em um reservatório de poços profundos	1
			Novas placas de borda inteira de 96 poços	2, 3, 4, 5

13. Carregue os tubos de reagentes no suporte de reagentes como mostrado a seguir e selecione **OK**.

Tamanho do lote de amostras	Tipo de suporte	Trilha	Item	Posição no local
24, 48, 96	Reagente	47	2,5 mL de mistura de reparo de extremidades	1
			Mistura de poliadenilação preparada (volume total)	2
			Mistura de ligação preparada (volume total)	3
			10 mL de beads de purificação de amostras	4
			12 mL de tampão de hibridização	5

14. Guarde o restante dos 12 mL de tampão de hibridização (HT1) no recipiente para pooling.
15. Verifique se os suportes, os materiais de laboratório e os reagentes estão carregados conforme indicado e selecione **OK** na tela Library Deck Verification (Verificação da plataforma de bibliotecas).
16. Aguarde a conclusão da verificação automática do volume de reagente.
17. Observe o ML STAR durante as etapas automáticas.
18. Quando solicitado pelo Gerenciador de fluxo de trabalho, certifique-se de que a plataforma de carregamento do ML STAR esteja livre de obstruções para permitir que o ML STAR descarregue os suportes.
19. Selecione **Unload** (Descarregar) para descarregar a plataforma.
20. Inspecione a placa de bibliotecas para verificar a consistência dos volumes em cada poço.



CUIDADO

Se os volumes estiverem inconsistentes, as amostras podem ser reprovadas no controle de qualidade automatizado.

21. Se for armazenar, vede e retenha a placa de bibliotecas.
22. Descarregue os suportes, limpe a plataforma e selecione **OK**.

23. Insira comentários sobre os poços afetados e selecione **OK**.

24. Execute uma das seguintes etapas:

- Para continuar a quantificar bibliotecas, selecione **Yes** (Sim).
- Para parar, selecione **Exit** (Sair).

PONTO DE INTERRUPÇÃO SEGURA

Se for interromper o procedimento, vede a placa de bibliotecas antes do armazenamento. A placa de bibliotecas permanece estável por até 7 dias a partir da data de preparação entre -25°C e -15°C.

Quantificar bibliotecas

Preparação

1. Prepare os seguintes reagentes:

Reagente	Armazenamento	Instruções
Reagente de quantificação de DNA	2°C a 8°C	Proteja da luz. Descongele em temperatura ambiente por 30-150 minutos. (É recomendável remover o reagente no início do procedimento de preparar bibliotecas.) Agite para misturar e centrifugue ligeiramente.
Padrão de quantificação de DNA	2°C a 8°C	Agite para misturar e centrifugue ligeiramente.
Tampão de ressuspensão	2°C a 8°C	Agite para misturar.

2. Se a placa de bibliotecas tiver sido armazenada congelada, prepare-a da seguinte forma.
 - a. Confirme que a placa não foi armazenada por mais de 7 dias e descongele em temperatura ambiente.
 - b. Agite para misturar.
 - c. Centrifugue a 1000 × g por 1 minuto.
3. Ligue o fluorímetro 10 minutos antes de usar.
4. Aplique um código de barras a uma nova placa de 384 poços.
5. Aplique um código de barras a uma nova placa de borda inteira.

Procedimento

1. Selecione **OK** para iniciar a quantificação.
2. Se o método VeriSeq NIPT já não estiver aberto:
 - a. Abra o AppLauncher e selecione **VeriSeq NIPT Method** (Método VeriSeq NIPT).

- b. Insira o ID do lote e o nome do usuário e selecione **OK**.
- Faça a leitura dos códigos de barra da caixa de acessórios.
 - Insira o nome do usuário ou as iniciais do preparador do reagente e selecione **OK**.
 - Carregue as pontas nos suportes das pontas conforme indicado a seguir e selecione **OK**.

Tamanho do lote de amostras	Suporte Tipo	Trilha	Item	Posição no 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

- Certifique-se de que os códigos de barra estejam fixados.
- Se necessário, remova a vedação das placas de bibliotecas.
- Carregue as placas (com o código de barras virado para a direita) no suporte Multiflex conforme indicado a seguir e selecione **OK**.

Tamanho do lote de amostras	Suporte Tipo	Trilha	Item	Posição no local
24, 48, 96	Multiflex	19–24	Novas placas de borda inteira 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 borda inteira de 96 poços	4, 5

- Carregue os tubos de reagentes sem as tampas no suporte dos tubos como indicado a seguir e selecione **OK**.

Tamanho do lote de amostras	Suporte Tipo	Trilha	Item	Posição no local
24, 48, 96	Tubo	46	Padrão de quantificação de DNA	1
			Reagente de quantificação de DNA	2

10. Carregue os tubos de reagentes no suporte de reagentes como mostrado a seguir e selecione **OK**.

Tamanho do lote de amostras	Suporte Tipo	Trilha	Item	Posição no local
24, 48, 96	Reagente	47	Novo tubo de reagente (vazio)	1
			16 mL de tampão de ressuspensão	2

11. Se você tiver interrompido o protocolo após o procedimento de preparação da biblioteca, carregue as pontas contadas nos suportes das pontas conforme indicado a seguir.

Tamanho do lote de amostras	Suporte Tipo	Trilha	Item	Posição no local
24, 48, 96	Ponta	49–54	Pontas de 1000 µL	1
			Pontas de 300 µL	2
			Pontas de 50 µL	3

12. Insira o local da primeira e da última ponta para cada rack de pontas e selecione **OK**.
13. Certifique-se de que os suportes, o material do laboratório e os reagentes estejam carregados conforme indicado e selecione **OK** na tela Quant Deck Verification (Verificação da plataforma de quantificação).
14. Aguarde a conclusão da verificação automática do volume de reagente.
15. Observe o ML STAR durante as etapas automáticas.
16. Quando solicitado pelo Gerenciador de fluxo de trabalho, certifique-se de que a plataforma de carregamento do ML STAR esteja livre de obstruções para permitir que o ML STAR descarregue os suportes.
17. Selecione **Unload** (Descarregar) para descarregar a plataforma.
18. Descarregue a placa de bibliotecas.
- Inspeção a placa para verificar a consistência dos volumes em cada poço.
 - Vede a placa de bibliotecas e armazene em temperatura ambiente até que a análise de dados fluorimétricos esteja concluída.
19. Descarregue as placas de 96 poços restantes e verifique a consistência dos volumes em cada poço. Erros relevantes no volume podem indicar um problema nas etapas de pipetagem.
20. Descarregue a placa de 384 poços e verifique se existe líquido nos poços adequados.
21. Coloque um selo de alumínio na placa.
22. Centrifugue a 1000 × g por 20 segundos.
23. Incube em temperatura ambiente durante 10 minutos, ao abrigo da luz.
24. Descarregue todos os suportes.
25. Limpe a plataforma do ML STAR e selecione **OK**.



CUIDADO

Não descarte os reagentes de quantificação até que os dados sejam obtidos. Você ainda precisará dos reagentes se tiver de executar uma nova quantificação.

26. Após a incubação, remova o selo de alumínio e coloque a placa de 384 poços no leitor de microplacas. Certifique-se de usar a placa adaptadora roxa (peça n.º 0310-4336) fornecida pela Molecular Devices ou equivalente, se aplicável ao instrumento usado.
 - Certifique-se de que A1 esteja no canto superior esquerdo ao carregar.
27. Clique duas vezes no modelo do VeriSeq NIPT para abri-lo no SoftMax Pro.
28. Selecione **New Experiment** (Novo experimento) na guia Home (Página inicial).
29. Selecione **Read** (Ler).
30. Exporte os dados como XML, como a seguir:
 - a. Clique com o botão direito em **Plate** (Placa) e selecione **Rename** (Renomear).
 - b. Leia o código de barras da placa de quantificação e selecione **OK**.
 - c. No canto superior esquerdo da tela, selecione o ícone da placa e selecione **Export** (Exportar) no menu.
 - d. Marque a caixa de seleção **Expt name** (Nome da exportação), defina a opção de dados da placa como brutos, defina o formato de saída como XML e selecione **OK**.
 - e. Defina o caminho e o nome do arquivo de saída e selecione **Save** (Salvar).O computador Hamilton deve ser capaz de acessar o local do arquivo. Não use espaços no nome ou no caminho do arquivo.

Análise

1. No ML STAR, na tela Scanner Information (Informações do scanner), insira o ID do fluorímetro.
2. Insira comentários sobre a execução do fluorímetro e selecione **OK**.
3. Navegue até o arquivo de quantificação *.xml que contém os dados fluorimétricos e selecione **OK**.
4. Examine a curva padrão e os resultados da análise de concentração da amostra e selecione **OK**.
5. Se for necessário repetir a leitura da placa, selecione **Rescan** (Repetir leitura).

As amostras são sensíveis ao tempo e à luz. Quando necessário, repita a leitura imediatamente.
6. Insira comentários sobre os poços afetados e selecione **OK**.
7. Avalie os resultados e continue conforme indicado a seguir.
 - Se os resultados forem aprovados dentro da especificação, avance para as [Bibliotecas de pool na página 39](#). Para conhecer as especificações, consulte a tabela de métricas e limites do CQ para quantificação no *Guia do software VeriSeq NIPT Solution v2 (documento n.º 1000000067940)*.
 - Se os resultados não forem aprovados segundo as especificações, o sistema abortará o método. Repita os procedimentos de quantificação, começando pela [Preparação na página 35](#).
8. Execute uma das seguintes etapas:
 - Para prosseguir para as [Bibliotecas de pool na página 39](#), selecione **Yes** (Sim).

- Para parar, selecione **Exit** (Sair).

PONTO DE INTERRUÇÃO SEGURA

Se for interromper o procedimento, vede a placa de bibliotecas antes do armazenamento. A placa de bibliotecas permanece estável por até 7 dias de armazenamento acumulado entre -25°C e -15°C.

Bibliotecas de pool

Preparação

1. Prepare os seguintes reagentes:

Reagente	Armazenamento	Instruções
Tampão de hibridização	-25°C a -15°C	Descongele em temperatura ambiente. Agite para misturar. Volte a armazenar após o uso.

2. Se a placa de bibliotecas tiver sido armazenada congelada, prepare-a da seguinte forma.
 - a. Confirme que a placa não foi armazenada por mais de 7 dias e descongele em temperatura ambiente.
 - b. Agite a 1500 rpm por 1 minuto.
 - c. Centrifugue a 1000 × g por 20 segundos.
 - d. Pipete para misturar.
3. Etiquete um tubo de pooling vazio como Pool A. Para 96 amostras, etiquete um segundo tubo de pooling vazio como Pool B.
4. Guarde o seguinte programa de desnaturação no termociclador com uma tampa aquecida.
 - a. Escolha a opção de tampa pré-aquecida e ajuste em 102°C.
 - b. Defina o volume da reação em 50 µL.
 - c. Defina a taxa de aumento no máximo (≥ 2°C por segundo).
 - d. Incube a 96°C por 10 minutos e, depois, a 4°C por 5 segundos.
 - e. Mantenha a 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 que a quantificação tenha sido aprovada pelas métricas de CQ, pois pode ser necessário repetir a quantificação.
2. Centrifugue a placa de bibliotecas a 1000 × g por 20 segundos.
3. Selecione **OK** para iniciar as bibliotecas de pool.
4. 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. Insira o ID do lote e o nome do usuário e selecione **OK**.

5. Selecione a concentração do pool e selecione **OK**.
A densidade-alvo do cluster é de 220–260 K/mm².

OBSERVAÇÃO A concentração do pooling e/ou o volume do pooling podem precisar ser aumentados para lotes de 24 amostras a fim de manter densidades de pooling semelhantes obtidas com lotes de 48/96 amostras.

6. Se solicitado pelo Gerenciador de fluxo de trabalho, execute uma das seguintes etapas:
- Para carregar uma planilha de amostras, selecione a planilha de amostras associada ao lote e selecione **Load** (Carregar).
 - Para usar valores padrão do sistema para os tipos de amostra remanescentes, informações sobre o sexo ou tipo de triagem, selecione **Use Default** (Usar padrão) para cada definição.
Para obter informações sobre a criação de uma planilha de amostras, consulte o *Guia do software VeriSeq NIPT Solution v2 (documento n.º 1000000067940)*.
7. Selecione **Start** (Iniciar) para iniciar o temporizador da placa de desnaturação.
8. Carregue as pontas nos suportes das pontas conforme indicado a seguir.

Tamanho do lote de amostras	Suporte Tipo	Trilha	Item	Posição no local
24, 48, 96	Ponta	7–12	Pontas de filtro de 50 µL	1

9. Carregue a placa de biblioteca desnaturada (com o código de barras virado para a direita) no suporte Multiflex conforme indicado a seguir e selecione **OK**.

Tamanho do lote de amostras	Suporte Tipo	Trilha	Item	Posição no local
24, 48, 96	Multiflex	19–24	Placa de biblioteca desnaturada (com código de barras)	1

10. Carregue os tubos de pooling no suporte dos tubos como indicado a seguir e selecione **OK**.

Tamanho do lote de amostras	Suporte Tipo	Trilha	Item	Posição no 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. Carregue os tubos de reagentes no suporte de reagentes como mostrado a seguir e selecione **OK**.

Tamanho do lote de amostras	Suporte Tipo	Trilha	Item	Posição no local
24, 48, 96	Reagente	47	3 mL de tampão de hibridização	1

12. Carregue as pontas nos suportes das pontas conforme indicado a seguir.

Tamanho do lote de amostras	Suporte Tipo	Trilha	Item	Posição no 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. Insira o local da primeira e da última ponta para cada rack de pontas e selecione **OK**.
14. Verifique se os suportes, os materiais de laboratório e os reagentes estão carregados conforme indicado.
15. Na tela Pooling Deck Verification (Verificação da plataforma de pooling), selecione **OK**.
16. Observe o ML STAR durante as etapas automáticas.
17. Insira comentários sobre os poços afetados e selecione **OK**.
18. Quando solicitado pelo Gerenciador de fluxo de trabalho, certifique-se de que a plataforma de carregamento do ML STAR esteja livre de obstruções para permitir que o ML STAR descarregue os suportes.
19. Selecione **Unload** (Descarregar) para descarregar a plataforma.
20. Descarregue o suporte dos tubos.
21. Tampe cada tubo de pooling, agite e centrifugue rapidamente.
22. Selecione **OK**.
23. Faça o sequenciamento das bibliotecas logo depois do pooling. Se necessário, vede a placa de bibliotecas e armazene-a entre -25°C e -15°C por até 7 dias para permitir a repetição do pooling.

PONTO DE INTERRUPÇÃO SEGURA

Se for interromper o procedimento, tampe os tubos de pooling e armazene entre -25°C e -15°C por no máximo 7 dias.

Preparar bibliotecas de pool para sequenciamento

Preparação

1. Prepare os seguintes reagentes:

Reagente	Armazenamento	Instruções
Tubos de pool	-25°C a -15°C	Se tiver sido anteriormente armazenado, descongele em temperatura ambiente. Agite ligeiramente. Centrifugue ligeiramente.

2. Prepare o sistema de sequenciamento de última geração preenchendo os seguintes campos no módulo VeriSeq NIPT Local Run Manager:

- a. Nome da execução
- b. [Opcional] Descrição da execução
- c. Código de barras do pool



CUIDADO

O código de barras do pool inserido no módulo Local Run Manager deve corresponder ao código de barras do pool inserido no Gerenciador de fluxo de trabalho. Configurações incorretas de execução são rejeitadas pelo software de análise e exigem a repetição do sequenciamento.

Para obter mais informações sobre o uso do módulo VeriSeq NIPT Local Run Manager, consulte o *Guia do software VeriSeq NIPT Solution v2 (documento n.º 1000000067940)*.

Procedimento

1. Combine os seguintes volumes ao cartucho de reagente e pipete para misturar.
 - Tampão de hibridização (900 µL)
 - 450 µL de Pool A (450 µL)
2. Prossiga o sequenciamento usando o guia de referência do instrumento de sequenciamento de última geração. Para um NextSeq 550Dx, consulte o *Guia de referência do instrumento NextSeq 550Dx (documento n.º 1000000009513)* (ou consulte o folheto informativo aplicável, conforme consta na página de suporte da Illumina www.support.illumina.com).
3. Confirme a configuração de execução correta, quando solicitado.
4. Se necessário, repita esse procedimento para o Pool B.
 - Para alcançar a faixa de densidade de cluster pretendida, o pool da placa de bibliotecas pode ser repetido com uma diferente concentração de pooling no Hamilton. A repetição do pool invalida o pool original.
 - Como alternativa, a relação pool/HT1 (450 µL + 900 µL) pode ser modificada para atingir a faixa de densidade-alvo do cluster.

Sequenciamento de última geração

O VeriSeq NIPT Solution v2 pode ser usado com um sequenciador de última geração com as seguintes especificações:

- Capacidade de 2x36 leituras tipo paired-end.
- Compatibilidade com adaptadores de índice do VeriSeq NIPT Sample Prep Kit.
- Química de dois canais
- Produção automática de arquivos BCL (*.bcl) (dados brutos do instrumento de sequenciamento)
- 400 milhões de leituras tipo paired-end por execução
- Compatível com o VeriSeq NIPT Assay Software v2

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

Análise de dados da sequência

Após a conclusão do sequenciamento, os dados do sequenciamento são automaticamente enviados ao VeriSeq NIPT Assay Software v2 para análise e geração de relatórios. O relatório inclui classificações para cada tipo de amostra do lote, além de uma avaliação das métricas de CQ de todas as execuções. O processo de análise desde a conclusão do sequenciamento até os resultados finais demora aproximadamente 4 horas para um lote de 48 amostras. Para obter informações detalhadas sobre a análise de dados e o arquivo 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 emprega um sofisticado modelo estatístico que combina vários tipos diferentes de informações baseadas na coleta de fragmentos de bibliotecas com sequenciamento tipo paired-end. Esse modelo é usado para detectar regiões do genoma que são sub-representadas ou sobre-representadas na biblioteca de cada amostra. É importante observar que esse modelo considera se o grau de sub-representação ou sobre-representação é quantitativamente consistente com um evento de aneuploidia no genoma fetal no nível da fração fetal estimada para a biblioteca.

Para todos os cromossomos, os dados do sequenciamento tipo paired-end são alinhados com o genoma de referência (HG19). Leituras alinhadas não duplicadas exclusivas são agregadas em subconjuntos de 100 kb. As contagens de subconjuntos correspondentes são ajustadas para viés guanina-citosina (GC) e de acordo com a cobertura genômica específica da região estabelecida anteriormente. Usando essas contagens de subconjuntos normalizadas, são geradas pontuações estatísticas para cada autossomo pela comparação das regiões de cobertura que podem ser afetadas por aneuploidias com o restante dos autossomos. É computada uma razão logarítmica de verossimilhança (LLR) para cada amostra ao serem levados em consideração esses escores baseados 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 vs. a probabilidade de uma amostra não ser afetada dada a mesma cobertura observada. O cálculo dessa relação também considera a incerteza estimada da fração fetal. Para cálculos subsequentes, é utilizado o logaritmo natural da relação. O software de ensaio avalia a LLR para cada cromossomo-alvo e cada amostra para fornecer uma determinação de aneuploidia.

Durante a criação do lote, você deve definir o tipo de amostra (gestação única ou gemelar), o tipo de rastreamento (básico ou genômico amplo) e as informações do sexo (Sim, Não, ACS) para cada amostra. Em conjunto, essas opções determinam as informações relatadas para cada amostra.

Para todos os tipos de amostra, o tipo de rastreamento determina quais anomalias autossômicas são relatadas. No rastreamento básico, são relatados somente eventos de trissomia de cromossomos inteiros envolvendo os cromossomos 13, 18 e 21. No rastreamento genômico amplo, são relatadas deleções ou duplicações completas ou parciais de qualquer cromossomo autossômico. O comprimento da menor deleção ou duplicação parcial cromossômica relatável é de 7 Mb.

Para amostras de gestação única, é possível desativar as informações do cromossomo sexual. Você também pode configurar o relato de aneuploidias do cromossomo sexual informando ou não o sexo de amostras euploides.

Para amostras de gestações gemelares, se for selecionado Yes (Sim) para as informações do cromossomo sexual, o resultado será limitado ao relato da presença ou ausência de um cromossomo Y na biblioteca. A aneuploidia do cromossomo sexual não pode ser informada para amostras de gestações gemelares.

OBSERVAÇÃO Quando todas as amostras de um lote tiverem o mesmo sexo relatado, uma notificação de erro por e-mail/WebUI alertará o usuário com uma advertência de mistura/contaminação da amostra. O lote será invalidado e nenhum relatório será produzido. (Aplicável ao software do servidor v2.2 do VeriSeq NIPT Solution v2 e superiores.)

Um resultado ANOMALY DETECTED (ANOMALIA DETECTADA) indica que a amostra é positiva para uma ou mais anomalias consistentes com o tipo selecionado de rastreamento e opção de informação do cromossomo sexual. Quando uma anomalia é detectada, o relatório fornece uma descrição da anomalia em notação citogenética.

O VeriSeq NIPT Assay Software v2 usa dados estatísticos gerados durante o sequenciamento para fornecer uma estimativa da fração fetal (EFF) para cada amostra. A EFF é o componente fetal estimado do cfDNA que é recuperado pelo ensaio e relatado como percentual arredondado para cada amostra. O desvio padrão médio dessa estimativa em todas as amostras é de 1,3%. A EFF não deve ser usada isoladamente para excluir amostras no relatório dos resultados.

Para fazer identificações da representação cromossômica, o VeriSeq NIPT Assay Software v2 usa o Teste individualizado de confiança de aneuploidia fetal (iFACT), uma métrica dinâmica de limite que indica se o sistema gerou uma cobertura de sequenciamento suficiente, considerando a estimativa da fração fetal para cada amostra. Identificações negativas só serão relatadas se a amostra estiver dentro do limite do iFACT. Se uma amostra não atinge esse limite, a avaliação de CQ exibe FAILED iFACT (FALHA NO iFACT) e o sistema não gera qualquer resultado.

Além do iFACT, o VeriSeq NIPT Assay Software v2 avalia diversas outras métricas de CQ durante a análise. As métricas adicionais incluem avaliações da uniformidade da cobertura em regiões genômicas de referência e a distribuição dos comprimentos dos fragmentos de cfDNA. A avaliação de CQ exibe um alerta de CQ ou uma falha de CQ para qualquer métrica que estiver fora do intervalo aceitável. No caso de falha de CQ, o sistema não gera qualquer resultado para a amostra. Se uma amostra não passar no CQ, ela poderá ser reprocessada caso exista um volume de plasma suficiente no tubo de coleta de sangue.

O VeriSeq NIPT Solution v2 gera dados para uso em um relatório final. Ele não gera um relatório final para o paciente. Os clientes são responsáveis pela criação e conteúdo do relatório final a ser entregue ao médico do local de atendimento. A Illumina não é responsável pela exatidão do texto do relatório final para os clientes.

**CUIDADO**

Verifique as estimativas da fração fetal de todas as amostras. Se as estimativas da fração fetal forem similares para todas as amostras de uma execução, significa que poderá ter ocorrido mistura das amostras, afetando os resultados. Entre em contato com o suporte técnico da Illumina para ajudar na solução do problema.

Características de desempenho

Os seguintes dados descritos nas seções de desempenho clínico e desempenho analítico foram gerados com os protocolos e os materiais descritos nas Instruções de uso, começando pelo plasma. Todos os dados de sequenciamento desta seção foram gerados em um sistema de sequenciamento NextSeq 500/550 ou em um sistema de sequenciamento NextSeq 550Dx com as seguintes configurações:

	NextSeq 500/550	NextSeq 550Dx
Software do instrumento	NextSeq Control Software 4.0	NextSeq Operating Software 1.3
Versão de 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 sequenciamento	Execução de sequenciamento tipo paired-end 2x36 em modo de alto rendimento	Execução de sequenciamento tipo paired-end 2x36 em modo de alto rendimento

Estudo clínico

A precisão clínica do VeriSeq NIPT Solution v2 foi demonstrada pela avaliação de amostras de plasma de mulheres com gestações únicas e gestações gemelares. As amostras foram obtidas de amostras de plasma armazenadas não identificadas previamente processadas com base em sangue total periférico. Mais de 45 mil amostras foram consideradas para inclusão no estudo. Essas amostras foram previamente submetidas a um rastreamento pré-natal para detecção de aneuploidias cromossômicas fetais e deleções e duplicações parciais de 7 Mb ou mais. Todas as amostras de gestações afetadas e um subgrupo de amostras consecutivas de gestações não afetadas foram qualificados para os testes no caso de os desfechos clínicos estarem disponíveis e os critérios das amostras serem cumpridos. Um total de 2.335 amostras compôs o grupo de análise do teste. Desse grupo, 2.328 amostras foram de gestações únicas e sete amostras de gestações gemelares.

Dessas amostras, 28 (1,2%, 28/2335) não passaram no CQ do ensaio na primeira passagem durante a análise dos dados de sequenciamento concluídos:

- 27 falhas no iFACT (1 XO, 26 não afetadas)
- Uma falha em dados fora do intervalo esperado

Dados demográficos e características da gestação

A idade materna, a idade gestacional e o trimestre da gestação são resumidos na [Tabela 7](#) para as amostras do rastreamento genômico amplo, incluindo amostras de mosaicos conhecidos. A maioria (98%) das amostras de teste representa o primeiro trimestre de gestação.

Os dados demográficos foram avaliados entre as coortes básica e genômica ampla e não mostraram diferença estatística. Os dados demográficos e as características da gestação foram similares incluindo ou excluindo os mosaicos conhecidos.

Tabela 7 Dados demográficos e características da gestação

Estatística sumarizada	Rastreamento genômico amplo (incluindo mosaicos conhecidos)
Número de amostras	2307*
Idade materna – anos	
Média	35,08
Desvio padrão	4,04
Mediana	34,95
Percentil 25, percentil 75	32,31; 37,79
Mínimo, máximo	20,22; 53,02
Idade gestacional na punção venosa - semanas	
Média	10,93
Desvio padrão	1,20
Mediana	10,57
Percentil 25, percentil 75	10,29; 11,14
Mínimo, máximo	10,00; 27,86
Trimestre da gestação – n (%)	
< Primeiro (<14 semanas)	2.252 (98%)
Segundo	54 (2%)
Terceiro (≥27 semanas)	1 (0%)

* As amostras finais apresentadas continham 7 gêmeos.

Desempenho clínico

Os resultados identificados pelo VeriSeq NIPT Solution v2 foram comparados com os resultados do padrão de referência clínica. Todas as amostras do estudo apresentaram os resultados do padrão de referência clínica (verdade clínica) relacionados com a condição de aneuploidia cromossômica fetal e deleções parciais e duplicações de 7 Mb ou mais. O resultado do padrão de referência clínica para as amostras incluídas neste estudo dependeu dos resultados da análise cromossômica ou de um exame físico no recém-nascido com uma triagem negativa do NIPT baseada em NGS. Uma equipe treinada do estudo realizou a classificação dos dados padrão de referência clínica de acordo com o documento Medical Coding do patrocinador.

Os métodos de análise cromossômica incluíram cariotipagem, hibridização in situ por fluorescência (FISH) ou hibridização genômica comparativa por microarray (CMA). A análise cromossômica foi realizada em amostras de sangue periférico ou de saliva, amostras de produtos de concepção (POC), amniócitos, vilosidades coriônicas, tecidos placentários ou sangue pós-natal do cordão umbilical de recém-nascidos ou lactentes.

Mosaicismo é definido como a presença de duas ou mais linhagens celulares de diferentes composições cromossômicas em um indivíduo. As linhagens celulares se originam do mesmo zigoto. O tipo e o nível de mosaicismo variam e dependem do momento dos eventos de mosaicismo durante a embriogênese e o desenvolvimento fetal. Diferentes tipos de mosaicismo ocorrem nos diagnósticos pré-natais, dependendo da distribuição das linhagens celulares anormais e normais no citotrofoblasto, no mesênquima ou no feto.¹⁰ Embora possa ser observado mosaicismo com qualquer anomalia cromossômica, a prevalência de mosaicismo em trissomias raras é mais alta do que nas trissomias dos cromossomos 21, 18 e 13 (T21, T18 e T13).¹¹ Na avaliação do desempenho, os casos de mosaicismo foram incluídos na análise genômica ampla, pois a finalidade deste tipo de triagem para este ensaio é detectar aneuploidias autossômicas raras (RAA).

Desempenho do rastreamento básico

Para o rastreamento básico, as anomalias incluem T21, T18 e T13. Um total de 2.243 amostras de gestações únicas e de gestações gemelares foi incluído na análise. Todas as sete gestações gemelares foram corretamente detectadas como T21 e não são informadas na tabela a seguir.

Tabela 8 Sensibilidade e especificidade do VeriSeq NIPT Solution v2 para a detecção de trissomias 21, 18, e 13 em um rastreamento básico de gestações únicas (excluindo mosaicos conhecidos)

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

O desempenho do ensaio no rastreamento básico mostrado na [Tabela 8](#) é calculado excluindo-se um subgrupo de 64 amostras afetadas por RAAs, deleções parciais ou duplicações autossômicas ou mosaicismo conhecido. Essas 64 amostras incluíram oito mosaicos T21 e três mosaicos T18. Cinco dessas 11 amostras foram identificadas como afetadas pela anomalia detectada pelo VeriSeq NIPT Assay Software v2.

Desempenho do rastreamento genômico amplo

Para o rastreamento genômico amplo, as anomalias incluem trissomias, monossomias e deleções ou duplicações parciais de 7 Mb ou mais. O rastreamento genômico amplo continha 36 amostras com mosaicismo conhecido. Foi testado um total de 2.307 amostras de gestações únicas e de gestações gemelares. Todas as sete gestações gemelares foram corretamente detectadas como portadoras de uma anomalia do cromossomo 21 e não são informadas nas tabelas a seguir.

Desempenho do rastreamento genômico amplo para qualquer anomalia

Tabela 9 Sensibilidade e especificidade do VeriSeq NIPT Solution v2 para a detecção de qualquer anomalia no rastreamento genômico amplo (incluindo mosaicos conhecidos)

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

Desempenho do rastreamento genômico amplo para aneuploidia autossômica rara

Tabela 10 Sensibilidade e especificidade do VeriSeq NIPT Solution v2 para aneuploidia autossômica rara (RAA) no rastreamento genômico amplo (incluindo mosaicos conhecidos)

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

Desempenho do rastreamento genômico amplo para deleções e duplicações parciais

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

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

Diferenças no desempenho entre o rastreamento básico e o rastreamento genômico amplo

A metodologia de pontuação para trissomias comuns e aneuploidias do cromossomo sexual é a mesma para os rastreamentos básico e genômico amplo. O rastreamento básico só aplica o algoritmo a T21, T18 e T13. Entretanto, o rastreamento genômico amplo expande essa metodologia para avaliar todas as trissomias e RAAs e duplicações e deleções parciais.

Existem duas diferenças entre o relatório de desempenho descrito entre os rastreamentos básico e genômico amplo. Em primeiro lugar, no rastreamento genômico amplo, amostras sem mosaïcismo comprovado para trissomias comuns e para RAAs e deleções e duplicações parciais foram incluídas para a métrica do desempenho. Em segundo lugar, o rastreamento genômico amplo pode, preferivelmente, relatar a detecção de uma duplicação ou deleção parcial em uma trissomia completa. A presença de uma trissomia completa, além de uma duplicação ou deleção parcial, pode ser observada referenciando-se a pontuação de LLR indicada no relatório suplementar.

Inclusão de mosaicos no rastreamento genômico amplo

O mosaïcismo é listado como uma limitação deste ensaio. Na presença de mosaïcismo, o sinal fetal de uma anomalia é reduzido e pode, portanto, ser de detecção mais difícil, sem comprometer a especificidade global do ensaio. Entretanto, uma vez que o mosaïcismo é mais relevante para conteúdo expandido, amostras com mosaïcismo foram incluídas no rastreamento genômico amplo.

Das 64 amostras incluídas no rastreamento genômico amplo, mas não no rastreamento básico, foi identificado que 36 amostras apresentavam mosaïcismo, segundo o padrão de referência clínica. Dessas 36 amostras, 23 identificações corresponderam ao padrão de referência clínica.

Detecção de deleção ou duplicação parcial versus aneuploidia de cromossomos inteiros

O VeriSeq NIPT Solution v2 apresenta opções de menu para rastreamento básico e rastreamento genômico amplo. No rastreamento básico, o resultado ANOMALY DETECTED (ANOMALIA DETECTADA) só é informado quando uma aneuploidia completa é detectada nos cromossomos 21, 18 e 13 e quando todas as métricas de controle de qualidade são cumpridas. No rastreamento genômico amplo, o sistema detecta aneuploidia em todos os autossomos e eventos de deleção e duplicação parcial de, pelo menos, 7 Mb.

No rastreamento genômico amplo, em casos nos quais um evento cromossômico completo e um evento CNV dentro do mesmo cromossomo excedem o limite de LLR, o sistema dá precedência, em termos de informações, a eventos de deleção ou duplicação parcial com relação à identificação de cromossomos inteiros se o tamanho da deleção ou duplicação parcial abrange um percentual menor ou igual a 75% do cromossomo em que o evento é detectado. Se a região detectada de deleção ou duplicação parcial for maior do que 75% do tamanho do cromossomo, o evento será relatado como trissomia ou monossomia completa de todo o cromossomo se, simultaneamente, o limite de LLR para todo o cromossomo também for excedido. Portanto, deleções e duplicações substancialmente grandes, maiores ou iguais a 75% do tamanho do cromossomo, podem ser indicativas de aneuploidia de um cromossomo inteiro.

Em todas as amostras, o escore da LLR para a classificação de cromossomos inteiros está disponível no relatório suplementar. O escore da LLR deve ser analisado com relação ao corte especificado na [Figura 2](#) antes da interpretação do resultado. Por exemplo, uma identificação de CNV em que os escores da LLR no nível do cromossomo que ultrapassam o corte fornecem suporte adicional para uma interpretação consistente com uma aneuploidia do cromossomo inteiro. Consulte a [Tabela 12](#) a título de exemplo.

No estudo clínico, houve duas amostras de gestações únicas com duplicações substancialmente grandes (uma no cromossomo 21 e outra no cromossomo 18) que eram significativamente menores do que 75% do tamanho relativo do cromossomo (consulte a [Tabela 12](#)). Ambos os eventos foram relatados como duplicações parciais em vez de uma trissomia completa para esse cromossomo. Os escores da LLR desses eventos estavam acima do corte, em consistência com um resultado de trissomia completa. Para a identificação de uma duplicação parcial ou trissomia completa, o tratamento de acompanhamento para uma identificação positiva no NIPT oferece à paciente um teste de confirmação por meio de um diagnóstico pré-natal.

Tabela 12 Exemplos de grandes eventos de duplicação identificados na triagem genômica ampla

	Verdade clínica	Resultado do sistema genômico amplo	Tamanho da anomalia (Mb)	% de cromossomos	Escore da LLR
Amostra 1	Gestação única com trissomia 21	Duplicação parcial no cromossomo 21	22,50	48,9	19,43
Amostra 2	Gestação única com trissomia 18	Duplicação parcial no cromossomo 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 controle de qualidade usadas para relatar resultados de aneuploidia.

Cromossomos sexuais

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

Tabela 13 Concordância percentual para classificação sexual do feto*

Classificação sexual do feto		Fenótipo do exame físico do recém-nascido		Resultados citogenéticos							
Detectado	Cariótipo	Feminino	Masculino	XX	XY	XO	XXX	XXY	XYY	Outros**	Ausente
Anomalia não detectada	XX	997	0	21	0	2	0	0	0	0	0

Classificação sexual do feto		Fenótipo do exame físico do recém-nascido		Resultados citogenéticos							
Detectado	Cariótipo	Feminino	Masculino	XX	XY	XO	XXX	XXY	XYY	Outros**	Ausente
Anomalia não detectada	XY	0	966	0	15	0	0	0	0	0	1
Anomalia detectada	XO	0	0	0	0	19	0	0	1	0	0
Anomalia detectada	XXX	0	0	0	0	0	17	0	0	1	0
Anomalia detectada	XXY	0	0	0	0	0	0	23	0	1	0
Anomalia detectada	XYY	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0
Total		997	966	21	15	21	17	23	12	2	1
Concordância percentual		100	100	100	100	90,5	100	100	91,7	Não aplicável	Não aplicável

* Cinco gestações gemelares foram corretamente classificadas como presença de Y. Duas gestações foram classificadas como sem presença de 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 relativas à capacidade do teste de informar decisões clínicas baseadas na sensibilidade e especificidade do teste e na probabilidade pré-teste de que o feto seja afetado por trissomia (prevalência). Como o VPP e o VPN dependem da prevalência, e a prevalência dessas aneuploidias pode variar nas diferentes populações de indivíduos, o VPP e o VPN foram calculados para um intervalo de valores de prevalências plausíveis com base nos valores de sensibilidade e especificidade observados na triagem básica (sem mosaicos conhecidos) do estudo clínico de precisão. A [Tabela 17](#) se baseia no rastreamento genômico amplo (com mosaicos conhecidos).

Tabela 14 Prevalência de trissomia 21, VPP e VPN no rastreamento 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 rastreamento 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 rastreamento 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

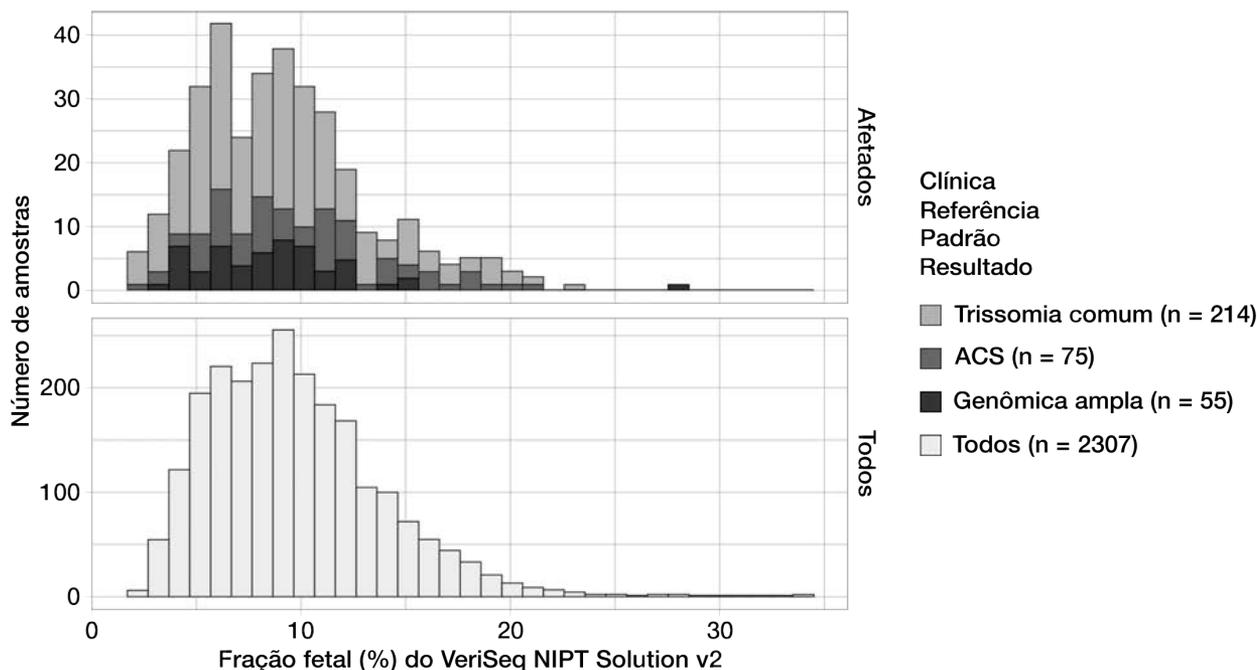
Tabela 17 Prevalência de qualquer anomalia, VPP e VPN no rastreamento genômico amplo (incluindo mosaicos conhecidos)

Prevalência (%)	VPP (%)	VPN (%)
0,01	1,42	> 99,99
0,02	2,81	> 99,99
0,05	6,74	> 99,99
0,10	12,64	> 99,99
0,20	22,45	99,99
0,50	42,07	99,98
1,00	59,34	99,95
1,50	68,75	99,93
2,00	74,68	99,91

Distribuição da fração fetal

A distribuição das estimativas da fração fetal (FF) do VeriSeq NIPT Solution v2 do rastreamento genômico amplo com mosaicos é mostrada por categoria do resultado do Padrão de Referência Clínica na [Figura 1](#).

Figura 1 Distribuição da fração fetal



5 amostras apresentaram anomalias em diversas categorias.

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

A genômica ampla inclui amostras com RAA ou deleções parciais e/ou duplicações.

As estimativas da FF variaram de 2% a 34%, em geral, com uma mediana de 9% e um intervalo interquartil (IQ) de 6% a 12%. A estimativa da mediana da FF para trissomias comuns e eventos detectados pelo rastreamento genômico amplo é de 8% e, para ACSs, é de 9%. O intervalo das estimativas da FF foi consistente para todos os resultados. Não existe qualquer desvio aparente na distribuição da FF entre trissomias comuns, ACSs, eventos detectados pelo rastreamento genômico amplo ou todas as amostras na análise genômica ampla.

Desempenho em gestações gemelares

Estimativa de desempenho em gestações gemelares para trissomia 13, 18 e 21 e cromossomo Y

Devido à baixa prevalência de trissomia 21, 18 e 13 em gestações gemelares, somente um pequeno número de amostras de gestações gemelares estava disponível para o estudo clínico. Para estimar o desempenho do VeriSeq NIPT Solution v2 em gestações gemelares, foram usados modelos *in silico* baseados em observações de amostras clínicas para simular populações de gestações gemelares. Essa simulação foi consistente com a população de uso previsto. A distribuição da fração fetal foi determinada com base em aproximadamente 4.500 amostras de gestações gemelares e comparada com a distribuição de aproximadamente 120 mil amostras de gestações únicas. A distribuição da fração fetal condicionada à condição de aneuploidia foi determinada com base em identificações supostas de gestações únicas (1.044 trissomias 21, 307 trissomias 18 e 192 trissomias 13). A combinação das duas distribuições permitiu inferências da detecção de aneuploidia em gêmeos. Grupos

de gêmeos dizigóticos e monozigóticos foram simulados, e foi determinada uma média ponderada representando sua prevalência na população de uso previsto (2 dizigóticos: 1 monozigótico) para estimar a sensibilidade. Para a especificidade, foram simulados grupos de gêmeos não afetados.

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

- Para gêmeos monozigóticos, a fração afetada de cada amostra foi definida em 1,0 porque, nesta situação, a trissomia afeta ambos os gêmeos.
- Para gêmeos dizigóticos, foi suposto que somente um dos gêmeos estava afetado (a ocorrência de ambos os gêmeos afetados é extremamente rara). Os valores da fração afetada foram simulados usando a distribuição conhecida das razões de fração fetal determinadas com base em amostras clínicas de gêmeos com discordância sexual. Foi usada uma abordagem conservadora por meio da qual foi suposto que o gêmeo afetado sempre tinha a fração fetal mais baixa. Foi aplicado um fator de correção para frações fetais que estavam, na média, mais baixas em gestações de trissomia 13 e 18.
- Para gêmeos não afetados, a fração afetada de cada amostra foi definida em zero.

Para gêmeos 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 únicas de trissomia 18 ou 13 em comparação com gestações únicas euploides.

A fração fetal global e a fração fetal afetada de cada amostra simulada foram, em seguida, usadas para calcular um escore de aneuploidia usando o algoritmo padrão do VeriSeq NIPT Solution v2. A sensibilidade foi calculada pela determinação da frequência em que os escores de aneuploidia das amostras simuladas afetadas de gêmeos estavam acima do corte de aneuploidia correspondente. Em paralelo, a especificidade foi calculada pela determinação da frequência em que os escores de aneuploidia das amostras simuladas não afetadas de gêmeos estavam abaixo do corte de aneuploidia correspondente ([Tabela 18](#)). Foram estimados intervalos de confiança de 95% com base no número de amostras clínicas reais de gêmeos no conjunto original de dados, que foram classificadas como afetadas ou não afetadas pela trissomia relevante.

Para estimar a sensibilidade para cromossomo Y nas amostras de gêmeos, foram simulados grupos de gêmeos XY/XY e XX/XY. Foi calculada a média ponderada representando sua prevalência na população de uso previsto (1 XY/XY: 1 XX/XY). Para estimar a especificidade do cromossomo Y em gêmeos, foi simulado um grupo de gêmeos XX/XX. Os valores da fração fetal global foram simulados segundo a distribuição conhecida da fração fetal em amostras clínicas de gêmeos.

Para gêmeos XY/XY e XX/XY, foram estimados escores correspondentes do cromossomo Y usando a relação conhecida entre a fração fetal e os escores do cromossomo Y em amostras clínicas de gestações únicas classificadas como do sexo masculino. Somente para gêmeos XX/XY, os valores da fração fetal afetada (ou seja, sexo masculino) foram simulados usando a distribuição conhecida das relações das frações fetais observadas entre gêmeos da mesma gestação, segundo amostras clínicas de gêmeos com discordância sexual. Foi usada uma abordagem conservadora, pela qual a fração afetada foi selecionada de modo a corresponder ao menor dos gêmeos. Para cada amostra simulada de XX/XY, o escore do cromossomo Y foi multiplicado pela fração afetada.

Para gêmeos XX/XX, os escores do cromossomo Y foram obtidos a partir dos escores observados em amostras clínicas de gestações únicas classificadas como do sexo feminino. O escore do cromossomo Y e a fração fetal global foram, em seguida, usados para classificar cada amostra simulada como cromossomo Y presente ou cromossomo Y ausente usando o algoritmo padrão do VeriSeq NIPT Solution v2.

A sensibilidade foi calculada pela determinação da frequência em que gêmeos simulados XY/XY ou XX/XY foram corretamente classificados como cromossomo Y presente. A especificidade foi calculada pela determinação da frequência em que gêmeos simulados XX/XX foram corretamente classificados como cromossomo Y ausente. Foram estimados intervalos de confiança de 95% com base no número de amostras clínicas reais de gêmeos no conjunto original de dados que foram classificadas como cromossomo Y presente ou cromossomo Y ausente.

Tabela 18 Estimativas da trissomia 21, 18 e 13 em uma população simulada de gestações gemelares

	Trissomia 21	Trissomia 18	Trissomia 13	Presença de Y
Sensibilidade	96,4%	95,7%	93,6%	> 99,9%
IC bilateral de 95%	(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 bilateral de 95%	(99,8%; > 99,9%)	(99,9%; > 99,9%)	(99,9%; > 99,9%)	(99,7%; > 99,9%)

A [Tabela 18](#) fornece estimativas pontuais e intervalos de confiança de 95% estimados para a sensibilidade e a especificidade do VeriSeq NIPT Solution v2 para detectar trissomia 21, 18 e 13 e a presença de Y em uma população simulada de gestações gemelares consistentes com a população de uso previsto. Os intervalos de confiança foram estimados com base no número de amostras clínicas de gêmeos aprovadas pelo CQ classificadas como afetadas ou não afetadas pela trissomia relevante. O cálculo da sensibilidade supõe que dois terços das gestações gemelares afetadas são dizigóticas, com um só gêmeo afetado, enquanto um terço das gestações gemelares afetadas são monozigóticas, com ambos os gêmeos afetados.

As estimativas indicadas na [Tabela 18](#) são relativas somente a gestações gemelares. Devido à prevalência ainda menor, os dados para gestações de ordem superior (trigêmeos ou mais) foram insuficientes para estabelecer os modelos estatísticos adequados para estimar a precisão da detecção de aneuploidias.

Desempenho analítico

Precisão

Para avaliar e quantificar a precisão do ensaio, foi conduzida uma reanálise dos dados usando o software de pipeline de análise do VeriSeq NIPT Solution v2 com base em dois estudos anteriores do VeriSeq NIPT Solution:

- Um estudo multicêntrico de reprodutibilidade que incluiu três execuções por três operadores em três centros usando um único lote de reagentes para um total de nove execuções.
- Um estudo de precisão intralaboratorial que incluiu 12 ensaios em um único centro, utilizando dois ML STARS, dois sistemas de instrumentos de sequenciamento e três lotes de reagentes de sequenciamento.

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

Foi criado um pool de T21 com fração fetal de 5% pela combinação do cfDNA extraído do plasma materno de gestantes (com um feto afetado por T21) e do cfDNA extraído de plasma de mulheres não gestantes. Também foi criado um pool de cfDNA materno-fetal masculino (feto XY) com fração fetal de 10%. O painel das amostras de cada estudo e de cada execução incluiu quatro replicações do pool de amostras afetadas por T21 com fração fetal de 5% e 20 replicações do pool de cfDNA materno-fetal masculino com fração fetal de 10%. Os testes foram executados ao longo de 10 dias para um total de 21 execuções nos dois estudos combinados.

T21 e a presença do cromossomo Y foram escolhidos para avaliação com base na representatividade das condições clínicas e na complexidade da detecção de anomalias. Sendo o menor autossomo humano, o tamanho do cromossomo 21 tem um impacto direto na sensibilidade da detecção de T21, particularmente em valores baixos da fração fetal, como os utilizados neste estudo. O cromossomo Y, estando presente no plasma materno, é de origem exclusivamente fetal e, portanto, mais fácil de ser detectado pelo ensaio.

A média e o desvio padrão observados para o escore da LLR do cromossomo 21 e os valores cromossômicos normalizados (NCV) do cromossomo Y que replicam o desvio padrão (DP) constituíram a maior fonte de variabilidade. Variações entre os centros, instrumentos e lotes de reagentes adicionaram uma quantidade insignificante de variabilidade, evidenciada pela diferença entre o DP total e o DP replicado na [Tabela 19](#) e na [Tabela 20](#).

Tabela 19 Resumo do desvio padrão (DP) da resposta do sequenciamento multicêntrico (reprodutibilidade)

Resposta	N	Média	DP replicado	DP total da reprodutibilidade*
Escore da LLR do cromossomo 21	36	34,43	11,36	11,36
NCV do cromossomo Y	180	190,56	7,96	10,20

* O total inclui a variabilidade decorrente da diferença entre centros, operadores, execuções, dias e replicações.

Tabela 20 Resumo da precisão da resposta do sequenciamento intralaboratorial

Resposta	N	Média	DP replicado	DP intralaboratorial total*
Escore da LLR do cromossomo 21	48	36,01	9,07	10,25
NCV do cromossomo Y	240	198,68	7,63	7,82

* O total inclui a variabilidade decorrente da diferença entre instrumentos de sequenciamento, lotes de reagentes, operadores, execuções, dias e replicações.

Foi realizado um estudo adicional para comparar a precisão de sequenciamento do VeriSeq NIPT Solution v2 (desvio padrão total) usando a versão 2.0 de uma lâmina de fluxo comparada com a versão 2.5. O estudo incluiu dois tipos de lâmina de fluxo (v2.0 e v2.5), três lotes de kits de sequenciamento, quatro sistemas de instrumentos e duas execuções de sequenciamento por combinação para um total de 48 execuções em um

único local. Foi preparado um pool de sequenciamento a partir de placas de cfDNA preparadas manualmente. O painel das amostras incluiu quatro replicações do pool de amostras afetadas por T21 com fração fetal de 5% e 20 replicações do pool de cfDNA materno-fetal masculino (feto XY) com fração fetal de 10%. Os resultados do estudo são apresentados na [Tabela 21](#) e indicam que não existe diferença na precisão do sequenciamento usando a lâmina de fluxo v2.0 ou a lâmina de fluxo v2.5.

Tabela 21 Resumo da precisão da resposta do sequenciamento com lâmina de fluxo v2.0 em comparação com a lâmina de fluxo v2.5

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

* O total inclui a variabilidade decorrente da diferença entre instrumentos de sequenciamento, lotes de reagentes, execuções, dias e replicações

**Baseado no teste F para a igualdade das variâncias (desvios padrão ao quadrado)

Contaminação cruzada

A contaminação cruzada foi avaliada no fluxo de trabalho da preparação de amostras do VeriSeq NIPT Solution. Pools de plasma de mulheres não gestantes (XX) e de homens adultos (XY) foram testados em um padrão de xadrez em 4 placas de 96 poços. N=48 cada para amostras femininas e masculinas por placa, para um total de 192 amostras femininas e 192 amostras masculinas. Nenhuma das amostras femininas demonstrou cobertura do cromossomo Y que fosse estatisticamente mais elevada do que a base estimada, não indicando qualquer contaminação cruzada por parte das amostras masculinas na mesma placa. Não foi observada contaminação cruzada detectável no VeriSeq NIPT Solution.

Substâncias potencialmente interferentes

O impacto de substâncias potencialmente interferentes foi determinado no VeriSeq NIPT Solution pela avaliação do desempenho do ensaio na presença destas substâncias.

Albumina, bilirrubina, hemoglobina e triglicerídeos (endógenos) foram individualmente colocados em pools de plasma materno originário de gestações do sexo feminino (fetos XX) não afetadas. Foram feitos testes em duas concentrações para cada substância de teste (n = 16 para cada). Não foram observadas interferências no desempenho do ensaio.

Tabela 22 Substâncias potencialmente interferentes (endógenas)

Substância de teste	Concentração baixa no teste (mg/mL)	Concentração alta no teste (mg/mL)
Albumina	35	50
Bilirrubina	0,01	0,15
Hemoglobina	100	200
Triglicérides	1,5	5

A presença de DNA genômico (gDNA) natural materno no plasma também pode interferir no desempenho do ensaio, pois ele pode ser extraído juntamente com o cfDNA fetal. Níveis de DNA genômico de 1,6, 3,3 e 4,9 ng por amostra (correspondentes a 1, 2 e 3 desvios padrão acima da concentração média esperada de gDNA depois de 7 dias de armazenamento de sangue total¹²) foram adicionados ao cfDNA extraído do plasma materno originário de gestações do sexo feminino (fetos XX) não afetadas. Em seguida, as amostras foram testadas no VeriSeq NIPT Solution (n = 16 para cada concentração). Não foram observadas interferências no desempenho do ensaio na presença de níveis elevados de gDNA.

Vinte substâncias potencialmente interferentes (exógenas) baseadas em medicamentos comumente usados ou prescritos durante a gestação foram testados segundo o EP7-A2 (Teste de interferência em química clínica, Diretriz aprovada, segunda edição). Os 20 possíveis interferentes foram combinados em quatro pools, colocados em plasma materno originário de gestações do sexo feminino (fetos XX) não afetadas e testados no VeriSeq NIPT Solution (N = 16 para cada pool). Não foram observadas interferências no desempenho do ensaio na presença dessas 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 detecção

O Limite de detecção (LOD) é definido como o nível de fração fetal que corresponde à probabilidade de detecção de 95% de uma condição de interesse, como T21. Para avaliar o LOD do VeriSeq NIPT Solution v2 para várias condições comuns, foram conduzidos estudos e análises estatísticas.

A probabilidade de detecção de uma condição de interesse em uma amostra afetada processada pelo VeriSeq NIPT Solution v2 depende, principalmente, de três fatores:

- Fração fetal
- Profundidade de sequenciamento

- Tamanho e complexidade da região genômica de interesse

Supondo uma profundidade de sequenciamento constante, uma determinada aberração é mais fácil de ser detectada em uma amostra com um percentual de fração fetal mais elevado do que em uma amostra com um percentual de fração fetal mais baixo. Por outro lado, supondo uma fração fetal constante, uma determinada aberração é mais fácil de ser detectada em uma amostra com profundidade de sequenciamento mais elevada do que em uma amostra com profundidade de sequenciamento mais baixa. Por último, aberrações em regiões genômicas menores ou mais complexas são mais difíceis de detectar do que em regiões genômicas maiores ou menos complexas, supondo fração fetal e profundidade de sequenciamento constantes.

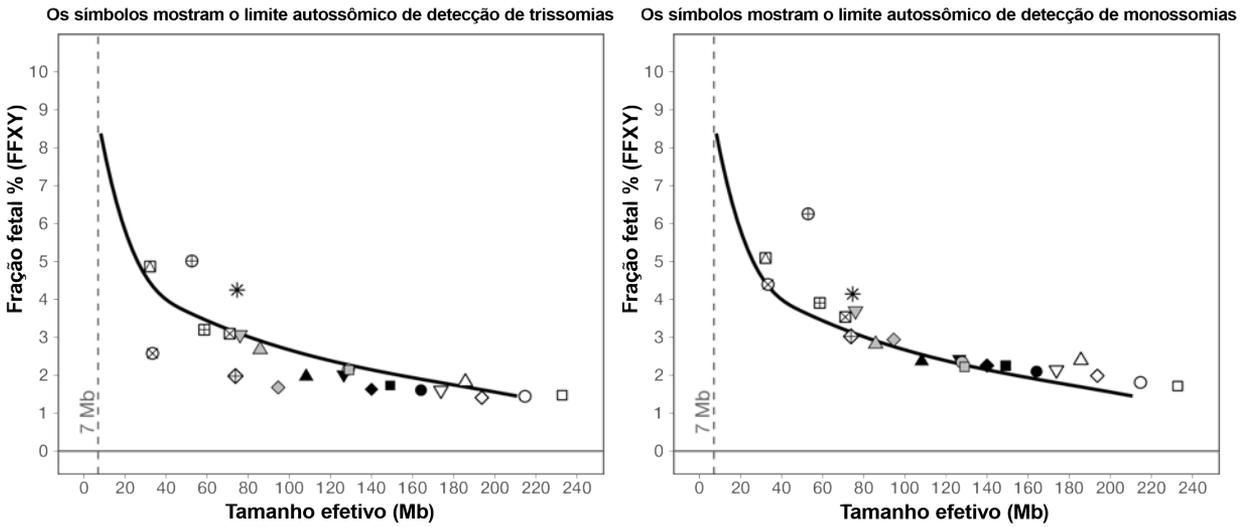
Para determinar o LOD para detecção de T21, foram analisadas amostras constituídas por misturas de amostras de pool de T21 e amostras de pool não afetadas. Os dois tipos de analitos foram misturados em uma série de titulação para criar um grupo de sete níveis de fração fetal (0, 2, 3, 4, 5, 6 e 10%). Cada nível foi representado por um total de 10 replicações.

Para aumentar ainda mais a resolução da grade de fração fetal para a análise do LOD, os dados deste estudo foram enriquecidos com dados obtidos de uma diluição *in silico*. Os efeitos da diluição experimental e da titulação foram simulados pela mistura controlada dos dados de sequenciamento. Os dados dessa titulação *in silico* abrangeram um grupo 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 replicações para cada nível. Foi aplicada uma análise probit aos dados resultantes para determinar o LOD para T21.

Além disso, um modelo estatístico usando fração fetal, profundidade de sequenciamento e tamanho/complexidade genômica foi desenvolvido para prever a probabilidade de detecção de qualquer aberração em qualquer amostra. Esse modelo foi estabelecido com base nos dados correspondentes a um grupo de 1.405 amostras XY. O LOD para T21 previsto por esse modelo, foi determinado como sendo concordante com a estimativa baseada na análise probit descrita acima. Esse modelo estatístico foi usado para estimar os valores de LOD para aneuploidias em todos os autossomos e para deleções e duplicações parciais.

A [Figura 2](#) mostra a probabilidade de detecção de 95% para regiões médias por tamanho e os limites de detecção autossômica de todas as trissomias e todas as monossomias. Corte da LLR CNV 15,1.

Figura 2 Probabilidades de detecção de 95% para regiões médias por tamanho com o VeriSeq NIPT Solution v2



Cromossomo	Símbolo	Trissomia		Monossomia	
		Limite de LLR (razão logarítmica de verossimilhança)	LoD (%)	Limite de LLR (razão logarítmica de verossimilhança)	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

Cromossomo	Símbolo	Trissomia		Monossomia	
		Limite de LLR (razão logarítmica de verossimilhança)	LoD (%)	Limite de LLR (razão logarítmica de verossimilhança)	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

Solução de problemas

Solução de problemas do VeriSeq NIPT Solution v2

Modo de falha	Possível resultado	Interpretação	Ação recomendada	Comentários
Introdução insuficiente de plasma	Falha de CQ da amostra	Volume de plasma insuficiente.	Faça uma nova coleta	Baseada na inspeção visual do volume de plasma.
Falha no tubo de sangue	O sangue não está separado em camadas	A amostra não foi centrifugada.	Certifique-se de que a centrífuga tenha sido acionada e que o tubo tenha sido girado com a força adequada. Faça uma nova coleta de amostra.	
		Armazenamento ou transporte inadequado da amostra (hemólise da amostra).	Faça uma nova coleta de amostra.	Amostras congeladas não se separam. Condições de armazenamento ou transporte inadequadas podem causar hemólise das amostras.

Modo de falha	Possível resultado	Interpretação	Ação recomendada	Comentários
Obstrução ou fluxo lento da amostra	Contaminação do plasma	Amostras individuais poderão obstruir a placa de ligação se houver contaminação significativa no plasma sanguíneo.	Inspeccione a amostra. Se o plasma remanescente no tubo estiver vermelho ou leitoso, cancele a amostra e solicite uma nova coleta. Se a amostra tiver aparência normal, repita o teste.	
	Transbordamento da amostra	Inspeção visual inadequada de cada tubo quanto à adequação da amostra.	Invalide todas as amostras dos poços adjacentes que foram afetadas pelo transbordamento.	Pode indicar que as amostras foram transportadas ou armazenadas de forma inadequada antes do processamento. Exclua as amostras inadequadas do processamento.
	Mau funcionamento do equipamento	Digestão inadequada do material durante a extração.	Teste a amostra novamente. Se o problema persistir no local dos poços com outras amostras, entre em contato com o Suporte técnico da Illumina.	

Modo de falha	Possível resultado	Interpretação	Ação recomendada	Comentários
Falha de CQ na análise de amostra individual	Falha de CQ de sequenciamento	As possíveis causas são: <ul style="list-style-type: none"> • Presença de material genético insuficiente • Transferência incorreta no manuseio da amostra • Falha do reagente de sequenciamento 	Verifique a anotação da amostra. Verifique se existe um desempenho semelhante em amostras anteriores na posição relativa da placa. Teste a amostra novamente.	Indica a introdução de uma amostra insuficiente ou uma transferência incorreta no ML STAR. O material genético insuficiente pode ser decorrente de DNA livre de células insuficiente no plasma ou DNA celular causando a diluição excessiva da amostra para o sequenciamento.
	Contagem baixa de FF ou locais não excluídos (NES)	Dados gerados insuficientes para criar um relatório preciso.	Teste o plasma novamente.	
Falha de CQ de quantificação	Falha na execução da quantificação. Mediana do lote abaixo do mínimo.	Rendimento insuficiente do processo.	Repita a quantificação. Se a repetição apresentar falha, entre em contato com o Suporte técnico da Illumina.	Métricas de curva padrão não aprovadas indicam problemas com a preparação da biblioteca (ou seja, uso de etanol de grau não biológico) ou problemas com o processo de quantificação.
	Falha na execução da quantificação	Falha na curva padrão.	Repita a quantificação. Se a repetição apresentar falha, entre em contato com o Suporte técnico da Illumina.	

Modo de falha	Possível resultado	Interpretação	Ação recomendada	Comentários
Falha no pooling	Falha na conclusão do pooling das amostras	A análise de pooling não pode calcular os volumes adequados de pool.	Reavalie a concentração-alvo de pool. Execute uma nova análise de pooling.	

Solução de problemas do VeriSeq NIPT Microlab STAR

Etapa do processo	Código de erro	Mensagem de erro	Descrição	Resolução do usuário
Criação de lote	EM0044	The Batch ID entered contains forbidden characters (O ID do lote inserido tem caracteres proibidos).	O VeriSeq NIPT Solution v2 só aceita números, letras, subtraços e traços em todos os campos de dados.	Renomeie o lote usando um nome que não contenha caracteres especiais.
Criação de lote	EM0051	The Batch ID is greater than 36 characters in length (O ID do lote tem mais de 36 caracteres).	O VeriSeq NIPT Solution v2 limita os nomes de lotes a 36 caracteres.	Renomeie o lote usando um nome com menos de 36 caracteres.

Etapa do processo	Código de erro	Mensagem de erro	Descrição	Resolução do usuário
Criação de lote	EM0076	Unable to connect to VeriSeq Onsite Server v2 (Não é possível fazer a conexão com o VeriSeq Onsite Server v2)	O VeriSeq Onsite Server v2 não está respondendo às solicitações de dados do Gerenciador de fluxo de trabalho.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Certifique-se de que o ML STAR esteja conectado à rede. 2. Certifique-se de que o VeriSeq Onsite Server v2 esteja ligado. 3. Verifique se o ML STAR pode se conectar ao VeriSeq Onsite Server v2 (por meio de solicitação de ping). 4. Se as etapas descritas acima não solucionarem o problema, entre em contato com o Suporte técnico da Illumina.
Criação de lote	EM0118	This batch has been failed and cannot be further processed (Este lote apresentou falha e não pode mais ser processado).	O lote especificado já apresentou falha e não pode continuar a ser processado.	O registro do lote no VeriSeq Onsite Server v2 indica que o lote selecionado falhou. Nenhum processamento adicional é permitido. Crie outro lote com as amostras desejadas.
Criação de lote	Não aplicável	This batch has already completed processing. (Este lote já concluiu o processamento). Would you like to repool? (Deseja repetir o pool?)	O lote indicado foi processado por pooling. O único processamento permitido é a repetição do pool.	Repita o pool conforme segue: <ul style="list-style-type: none"> • Selecione Re-Pool (Repetir o pool). • Interrompa o método e verifique se o nome do lote está correto antes de repetir o pool.
Isolamento de plasma	WP0087	Duplicate sample barcodes loaded (Foram carregados códigos de barras de amostras em duplicidade).	Amostras com códigos de barras idênticos foram carregadas no sistema.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Siga as instruções do Gerenciador de fluxo de trabalho para identificar as amostras em duplicidade. 2. Remova as duplicidades e as substitua ou etiquete novamente. 3. Recarregue as amostras.

Etapa do processo	Código de erro	Mensagem de erro	Descrição	Resolução do usuário
Isolamento de plasma	EP0102	Samples specified in the Sample Sheet were not loaded (As amostras especificadas na planilha de amostras não foram carregadas).	As amostras constantes da planilha de amostras não estão incluídas nos códigos de barra carregados.	<ol style="list-style-type: none"> Siga as instruções do Gerenciador de fluxo de trabalho para identificar as amostras faltantes. Selecione uma das seguintes opções: <ul style="list-style-type: none"> Adicione as amostras faltantes ao lote e recarregue as amostras. Interrompa o método, modifique a planilha 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 Gerenciador de fluxo de trabalho força a associação correta placa-lote com as máscaras de código de barras Venus.	<ol style="list-style-type: none"> Verifique a colocação da placa para confirmar se o layout da placa está correto. Certifique-se de que a placa carregada seja a placa correta para o lote indicado.
Extração de cfDNA	WE0150	Pressure in the vacuum chamber is too low. (A pressão na câmara de vácuo está excessivamente baixa).	O Gerenciador de fluxo de trabalho não avançará se a pressão da tubulação de vácuo em repouso for <400 Torr.	<ol style="list-style-type: none"> Verifique a existência de torções ou outras obstruções na tubulação de vácuo. Abra os grampos de liberação da tubulação de resíduos para liberar a pressão e feche os grampos de liberação da tubulação por completo. Certifique-se de que o controlador e a bomba de vácuo estejam ligados. Verifique o frasco de resíduos de vácuo. Se o frasco de resíduos estiver mais da metade cheio, esvazie-o. Se o problema persistir, entre em contato com o Suporte técnico da Illumina.

Etapa do processo	Código de erro	Mensagem de erro	Descrição	Resolução do usuário
Extração de cfDNA	WE0153	Pressure in the vacuum chamber is too high (A pressão na câmara de vácuo está excessivamente elevada).	Se a pressão de vácuo medida estiver excessivamente elevada antes do início do controle de pressão, o sistema poderá funcionar incorretamente.	Na parte traseira do controlador, certifique-se de que todas as conexões e tubulações de vácuo estejam firmes.

Etapa do processo	Código de erro	Mensagem de erro	Descrição	Resolução do usuário
Extração de cfDNA	WE0996	Vacuum failed to seal (Falha na vedação do vácuo).	A falha da vedação deve ser resolvida antes de continuar.	<p>Verifique se a falha na vedação foi resolvida antes de selecionar OK.</p> <ol style="list-style-type: none">1. Certifique-se de que a placa de ligação esteja nivelada com o coletor de vácuo. Com uma luva protegendo a mão, pressione com força a placa de ligação para baixo.2. Fique atento ao zumbido do vácuo e observe o fluxo de água através da placa de ligação.3. Abra a visualização de rastreamento no Gerenciador de fluxo de trabalho. Depois que a leitura de pressão real atingir pelo menos 50 unidades de pressão abaixo da leitura ambiente, selecione OK para continuar a extração de cfDNA.4. Se a leitura de pressão necessária não for atingida durante o tempo estipulado, selecione OK para continuar com a primeira carga de lisado.5. Pause o método depois que o lisado for dispensado na placa de ligação. Recoloque e pressione com força a placa de ligação para baixo.6. Se o lisado não fluir através da placa, entre em contato com o Suporte técnico da Illumina.

Etapa do processo	Código de erro	Mensagem de erro	Descrição	Resolução do usuário
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 permanecer ligado após a interrupção de um método durante a extração.	<ol style="list-style-type: none"> 1. No controlador de vácuo, pressione o botão Power (Alimentação) para desligar o vácuo. 2. Aguarde 10 segundos e pressione 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 apanhá-la etc.), o sistema solicitará que o usuário conclua o movimento da placa manualmente.	<p>Certifique-se de que seja possível recuperar a placa (sem material derramado).</p> <ul style="list-style-type: none"> • Se a placa não puder ser recuperada, interrompa a execução. • Se a placa puder ser recuperada, siga as instruções exibidas 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 registro).	A placa de ligação carregada não corresponde ao código de barras da placa removida.	Certifique-se de que a placa carregada corresponda ao código de barras registrado (consulte o registro do traçado do código de barras esperado).

Etapa do processo	Código de erro	Mensagem de erro	Descrição	Resolução do usuário
API	EA0372	Unable to connect to the data server (Não é possível fazer a conexão com o servidor de dados).	O VeriSeq Onsite Server v2 não está respondendo às solicitações de dados do Gerenciador de fluxo de trabalho.	<ol style="list-style-type: none">1. Certifique-se de que o ML STAR esteja conectado à rede.2. Certifique-se de que o VeriSeq Onsite Server v2 esteja ligado.3. Verifique se o ML STAR pode se conectar ao VeriSeq Onsite Server v2 (por meio de solicitação de ping).
	EA0774	Connection error. The API server connection failed to validate (Erro de conexão. Falha na validação da conexão ao servidor API).	O VeriSeq Onsite Server v2 deixou de responder às solicitações de dados do Gerenciador de fluxo de trabalho.	Confira os itens abaixo: <ol style="list-style-type: none">1. Certifique-se de que o ML STAR esteja conectado à rede.2. Verifique se o ML STAR pode se conectar ao VeriSeq Onsite Server v2 (por meio de solicitação de ping).3. Certifique-se de que o VeriSeq Onsite Server v2 esteja ligado.
	EA0780	403: Invalid Request (Solicitação inválida) The current transaction is not valid (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 entradas de dados excessivamente longas 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"> • Peça obsoleta n.º 20030577. • Requisito de capacidade máxima de tubos para centrífugas de tubos de coleta de sangue. <p>Adicionada</p> <ul style="list-style-type: none"> • Nova peça n.º 20101927 ao VeriSeq Onsite Server v2. • Unidade de dimensão para tubos de coleta de sangue de 10 mL. • Esclarecimento sobre as versões compatíveis do SoftMax Pro. • Nota de esclarecimento informando que apenas materiais plásticos compatíveis devem ser usados para garantir a intercambialidade com o VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Observação sobre o aviso de contaminação da mistura de amostras na seção Interpretação dos resultados. • Declaração de cuidado: não congele amostras de sangue total coletadas no BCT de DNA livre de células Streck. • Declaração de cuidado para evitar a exposição da amostra a temperaturas elevadas. • Esclarecimento sobre limitações do ensaio e condições de reprodutibilidade. • Esclarecimento sobre o corte LLR CNV na Figura 2 na seção Limite de detecção. <p>Atualizado</p> <ul style="list-style-type: none"> • Referência a tubos de reagentes compatíveis do tubo de reagentes Roche para o tubo de reagentes Illumina; adicionado novo número de peça. • Catálogo Thermo Fisher Multifuge X4 Pro-MD, peça n.º 75016034. • Declaração de cuidado de que poços com volumes inconsistentes podem fazer com que as amostras sejam reprovadas no CQ automatizado. • Referência ao folheto informativo do instrumento.
Documento n.º 1000000078751 v08	Agosto de 2022	<p>Atualização do número de peça do fluxo de trabalho</p> <p>Remoção da instrução de pipetar para misturar se a placa de bibliotecas estivesse congelada.</p>

Documento	Data	Descrição da alteração
Documento n.º 1000000078751 v07	Maio de 2022	<p>Divisão das limitações do procedimento nos relatórios do VeriSeq NIPT Solution v2 e inclusão dos dois primeiros marcadores. Texto restante no novo cabeçalho Limitações do ensaio.</p> <p>Removido</p> <ul style="list-style-type: none"> • VeriSeq do rótulo de todos os reagentes. • Aplicação de um código de barras à placa adaptadora do VeriSeq NIPT em Preparar bibliotecas. <p>Adicionada</p> <ul style="list-style-type: none"> • A palavra “certificada” para água livre de DNase/RNase. • Um dos seguintes leitores de microplacas, ou equivalente e SpectraMax M2, M3, M4, M5 e observação. • à seção VeriSeq NIPT Microlab STAR para explicar o que fazer durante um evento de tratamento de erros. • Uma observação para inspecionar visualmente os poços. • Instruções para lotes de 24 e 48 amostras nas seções do protocolo. • Etapas para uso da placa adaptadora roxa ou equivalente. • Texto na seção Dados demográficos e características da gestação, a fim de incluir os resultados da gestação no primeiro trimestre. • Um marcador nas especificações da placa de poço profundo para incluir resistência ao torque. <p>Atualizado</p>
		<ul style="list-style-type: none"> • Texto para nomes de lote exclusivos para maior clareza, incluindo um exemplo. • Símbolos e formatação para instâncias de Observação, Cuidado e Atenção. • Resultados dos submarcadores de teste. • Tiocianato de guanidina para cloridrato de guanidina. • CVS para BVS (sistema básico de vácuo) • Texto para usar o rastreamento genômico amplo e a pontuação LLR. • Especificações: Especificações para tubos de reagentes, placas de poços profundos, placas de 384 poços, placas de 96 poços
Documento n.º 1000000078751 v06	Agosto de 2021	Atualizado o endereço do Representante autorizado na UE.

Documento	Data	Descrição da alteração
Documento n.º 1000000078751 v05	Dezembro de 2020	<p>Atualização das seções Princípios de procedimentos, Advertências e precauções e Rotulagem de produtos com esclarecimentos adicionais para cumprir exigências regulatórias. Pequenas atualizações no conteúdo do protocolo de modo a corresponder ao estilo e à organização da Illumina.</p> <p>Corrigida a descrição do cromossomo 21 como "segundo menor autossomo humano" para "menor autossomo humano" na seção Precisão do Desempenho analítico.</p> <p>Adicionadas declarações de cuidado para abordar o uso inadequado de reservatórios e o risco de mistura de amostras às seções Preparação de plasma isolado e Interpretação de resultados.</p> <p>Adicionados novos números de peças do servidor e do software para o lançamento do novo modelo de servidor e atualizações dos números de peça do software.</p> <p>Adicionados cuidados às informações do protocolo e da solução de problemas para abordar e evitar transbordamentos de amostras.</p> <p>Atualizados os ingredientes ativos no reagente do Padrão de quantificação de DNA na caixa de acessórios de modo a estarem alinhados com a Ficha de dados de segurança.</p> <p>Atualizadas as convenções de nomenclatura do módulo VeriSeq NIPT Local Run Manager para consistência com outra documentação.</p> <p>Adicionado histórico de revisões.</p>
Documento n.º 1000000078751 v04	Outubro de 2020	Pequenas correções.
Documento n.º 1000000078751 v03	Setembro de 2020	Atualizada a lista de materiais para apresentar as especificações dos materiais de laboratório juntamente com as opções compatíveis conhecidas.

Documento	Data	Descrição da alteração
Documento n.º 1000000078751 v02	Fevereiro de 2020	Atualizadas as informações de apresentação do Desempenho clínico para transmitir melhor as diferenças entre os tipos de rastreamento básico e genômico amplo. Adicionadas novas Diferenças de desempenho entre os rastreamentos básico e genômico amplo. Removidas informações contraditórias sobre o caráter opcional do relatório suplementar da seção Princípios do procedimento. Atualizada a convenção de nomenclatura do software VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 ao longo do documento para consistência de estilo. Atualizada a rotulagem dos endereços da Illumina Austrália e Holanda para refletir alterações recentes.
Documento n.º 1000000078751 v01	Agosto de 2019	Removida a etapa em duplicidade de Extrair cfDNA causada por erro do software de publicação.
Documento n.º 1000000078751 v00	Mai de 2019	Versão inicial.

Patentes e marcas comerciais

Este documento e seu conteúdo são de propriedade da Illumina, Inc. e de suas afiliadas ("Illumina") e destinam-se exclusivamente ao uso contratual pelo cliente com relação ao uso dos produtos descritos neste documento e a nenhuma outra finalidade. O documento e seu conteúdo não devem ser usados ou distribuídos para qualquer outra finalidade, tampouco comunicados, divulgados ou reproduzidos de qualquer forma sem o consentimento prévio por escrito da Illumina. A Illumina não concede qualquer licença segundo seus direitos de patente, marca registrada, direitos autorais ou lei comum nem direitos semelhantes de terceiros por meio deste documento.

As instruções no documento devem ser estrita e explicitamente seguidas por pessoal devidamente treinado e qualificado para garantir o uso adequado e seguro dos produtos descritos neste documento. Todo o conteúdo do documento deve ser lido e compreendido por completo antes da utilização de tais produtos.

NÃO LER COMPLETAMENTE E NÃO SEGUIR EXPLICITAMENTE TODAS AS INSTRUÇÕES AQUI CONTIDAS PODE RESULTAR EM DANOS AO (S) PRODUTO(S), LESÕES PESSOAIS, INCLUSIVE AOS USUÁRIOS OU OUTROS, E DANOS EM OUTROS BENS, ANULANDO QUALQUER GARANTIA APLICÁVEL AO(S) PRODUTO(S).

A ILLUMINA NÃO SE RESPONSABILIZA POR QUALQUER PROBLEMA CAUSADO PELO USO INDEVIDO DO(S) PRODUTO(S) AQUI DESCRITOS (INCLUINDO PARTES OU SOFTWARE DOS PRODUTOS).

© 2023 Illumina, Inc. Todos os direitos reservados.

Todas as marcas comerciais pertencem à Illumina, Inc. ou aos respectivos proprietários. Para obter informações específicas sobre marcas comerciais, consulte www.illumina.com/company/legal.html.

Informações de contato



Illumina, Inc.

5200 Illumina Way

San Diego, California 92122, EUA

+1 (800) 809.ILMN (4566)

+1 (858) 202.4566 (fora da América do Norte)

techsupport@illumina.com

www.illumina.com

CE
2797



EC REP



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

Patrocinador australiano

Illumina Australia Pty Ltd

Nursing Association Building

Level 3, 535 Elizabeth Street

Melbourne, VIC 3000

Austrália

Dizeres de rotulagem dos produtos

Para explicações completas sobre os símbolos que constam da embalagem e rótulos dos produtos, consulte a legenda de símbolos em support.illumina.com na guia *Documentation* (Documentação) do seu kit.

Um Resumo da segurança e do desempenho (SSP, Summary of Safety and Performance) pode ser encontrado em <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>, após o lançamento do European Database on Medical Devices (Eudamed). Ele está vinculado ao UDI-DI Básico (0081627002NIPTRP).